

Molekulargenetische Effekte nach Inhibitorbehandlungen  
sowie Charakterisierung gonadenspezifisch exprimierter Gene  
von *Schistosoma mansoni*

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
im Fachbereich Biologie und Chemie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Christin Buro  
aus Osterburg

Gießen 2013

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Parasitologie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Tina E. Trenczek

Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie, Fachbereich Biologie und Chemie,  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph G. Grevelding

Institut für Parasitologie, Fachbereich Veterinärmedizin,  
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht am: 14.02.2013

Disputation am: 25.04.2013

*„Zweifel ist der Weisheit Anfang“*

René Descartes





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
1.1	Der Humanparasit <i>Schistosoma mansoni</i> .....	6
1.2	Die sexuelle Reifung des Weibchen als Folge der „Männchen-Weibchen-Interaktion“ .....	9
1.3	Identifikation von Signaltransduktionsmolekülen bei <i>Schistosoma mansoni</i> .....	11
1.3.1	Der TGFβ-Signalweg von <i>Schistosoma mansoni</i> .....	12
1.3.2	Tyrosinkinasen von <i>Schistosoma mansoni</i> mit Funktionen in den Gonaden .....	18
1.4	Anwendung kommerzieller chemischer Inhibitoren <i>in vitro</i> .....	22
1.4.1	Der TGFβ RI Kinase-Inhibitor (TRIKI) .....	24
1.4.2	Herbimycin A .....	25
1.5	Das Genom und Transkriptom von <i>S. mansoni</i> .....	26
1.6	Zielsetzungen dieser Arbeit.....	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>29</b>
2.1	Material.....	29
2.1.1	Puffer und Lösungen.....	29
2.1.2	Medien und Zusätze .....	30
2.1.3	Enzyme .....	32
2.1.4	Molekulargewichtsstandards .....	32
2.1.5	Bakterien- und Hefestämme .....	32
2.1.6	Antikörper .....	33
2.1.7	Primer .....	33
2.1.8	Plasmide .....	37
2.1.9	Verwendete siRNAs.....	39
2.1.10	Genbanken.....	39
2.1.11	Sequenzierungen .....	39
2.1.12	Internetprogramme.....	40
2.2	Methoden .....	41
2.2.1	Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i> unter Laborbedingungen .....	41
2.2.1.1	Isolierung der Eier und Zwischenwirtsinfektion.....	41
2.2.1.2	Endwirtsinfektion.....	41
2.2.1.3	Perfusion des Endwirts.....	42
2.2.2	<i>In vitro</i> Kultivierung adulter Schistosomen.....	42
2.2.2.1	<i>In vitro</i> Behandlung adulter Schistosomen mit Inhibitoren oder BrdU.....	42
2.2.3	Arbeit mit Bakterien .....	43
2.2.3.1	Herstellen von Bakterien-Glycerinstocks .....	43
2.2.3.2	Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur .....	43
2.2.3.3	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterienzellen .....	43
2.2.3.4	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen.....	44

2.2.3.4.1	Blau-Weiß-Selektion von Bakterien nach vorangegangener Transformation.....	44
2.2.4	Arbeit mit Hefen .....	45
2.2.4.1	Herstellen von Hefe-Glycerinstocks .....	45
2.2.4.2	Anzucht von Hefen als Flüssigkultur.....	45
2.2.4.3	Anzucht von Hefen auf Agarplatten.....	45
2.2.4.4	Herstellung kompetenter Hefezellen.....	45
2.2.4.5	Hefetransformation bzw. Co-Transformation .....	46
2.2.5	Isolation von Nukleinsäuren .....	46
2.2.5.1	DNA-Isolierung aus adulten <i>Schistosoma mansoni</i> .....	46
2.2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	47
2.2.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen.....	47
2.2.5.4	RNA-Isolierung aus adulten und larvalen Schistosomen .....	47
2.2.5.5	RNA-Isolierung aus Hefen.....	47
2.2.5.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	48
2.2.5.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	49
2.2.5.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	49
2.2.6	Enzymatische Reaktionen .....	50
2.2.6.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
2.2.6.1.1	Kolonie-PCR.....	51
2.2.6.1.2	Reverse Transkription (RT) .....	51
2.2.6.1.3	Quantitative PCR (qPCR) .....	52
2.2.6.1.4	<i>In vitro</i> -Mutagenese von Plasmid-DNA .....	54
2.2.6.2	Restriktionsanalysen von DNA-Sequenzen.....	55
2.2.6.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	55
2.2.6.3.1	Klonierung von PCR-Produkten .....	56
2.2.7	Quantifizierung der DNA-Synthese .....	56
2.2.8	Transfer von DNA auf eine Nitrocellulosemembran mittels <i>Slot-Blot</i> .....	57
2.2.9	RNA Interferenz in adulten Schistosomen .....	57
2.2.10	Morphologische Untersuchungen mittels <i>whole mount</i> Färbungen .....	58
2.2.10.1	Fixierung und Carminrot-Färbung adulter Schistosomen.....	58
2.2.10.2	Morphologische Untersuchung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie .....	58
2.2.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung adulter Schistosomen .....	58
2.2.11.1	Fixierung, Einbettung und Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten .....	58
2.2.11.2	Herstellung von Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	59
2.2.11.3	Transkriptblot und Detektion von Digoxigenin-markiertem UTP .....	59
2.2.11.4	Vorbereitung und Hybridisierung der Gewebeschnitte.....	61
2.2.11.5	Waschen der Gewebeschnitte und Detektion der Transkripte .....	61
2.2.12	<i>Yeast Two/Three-Hybrid</i> Experimente.....	62
2.2.12.1	$\beta$ -Galaktosidase Kolonie-Filterassay .....	63
2.2.12.2	$\beta$ -Galaktosidase Flüssigassay .....	64
2.2.13	<i>Germinal Vesicle Breakdown</i> -Analysen .....	65
2.2.14	Microarray Experimente .....	66
2.2.14.1	Probenvorbereitungen und Hybridisierung .....	67
2.2.14.2	Normalisierung, Datenfilterung, Signifikanzanalyse und hierarchische Anordnung .....	68
2.2.14.3	Bioinformatische, funktionelle Analyse .....	69

## 3 ERGEBNISSE .....70

<b>3.1 Inhibitorbehandlung von adulten Schistosomen und anschließende morphologische sowie transkriptionelle Analysen .....</b>	<b>70</b>
3.1.1 Überprüfung der Inhibition von SmT $\beta$ RI durch TRIKI anhand von <i>Germinal Vesicle Breakdown</i> -Analysen im <i>Xenopus</i> -Oocyten-System.....	71
3.1.2 <i>In vitro</i> Kulturexperimente adulter Schistosomen unter Verwendung der Inhibitoren TRIKI und Herbimycin A .....	74
3.1.3 Morphologische Untersuchungen adulter Schistosomen nach vorangegangenen Inhibitorbehandlungen .....	77
3.1.4 Microarray-Experimente nach vorangegangener Inhibitorbehandlung adulter Schistosomenweibchen .....	81
3.1.4.1 Identifizierung und erste Auswertung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung adulter Schistosomenweibchen mit TRIKI .....	82
3.1.4.1.1 Vergleich differentiell transkribierter Gene nach Behandlung mit TRIKI bzw. humanem TGF $\beta$ .....	84
3.1.4.2 Identifizierung und erste Auswertung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung adulter Schistosomenweibchen mit Herbimycin A .....	85
3.1.4.3 Identifizierung und erste Auswertung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung adulter Schistosomenweibchen mit TRIKI und Herbimycin A.....	87
3.1.5 Vergleich der signifikant differentiell transkribierten Gene der einzelnen Inhibitorbehandlungen .....	88
3.1.6 Validierung ausgewählter Gene mit inhibitorbehandlungsbedingter differentieller Transkription mittels quantitativen PCR.....	90
3.1.6.1 qPCR-Experimente zur Verifizierung der Microarray-Daten von differentieller Transkription, ausgelöst durch TRIKI-Behandlung .....	92
3.1.6.2 qPCR-Experimente zur Verifizierung der Microarray-Daten von differentieller Transkription, ausgelöst durch Herbimycin A-Behandlung.....	94
3.1.6.3 qPCR-Experimente zur Verifizierung der Microarray-Daten von differentieller Transkription, ausgelöst durch simultane TRIKI- und Herbimycin A-Behandlung.....	96
3.1.6.4 Transkriptionsanalyse verschiedener Gene der Eischalsynthese nach vorangegangenen Inhibitorbehandlungen.....	98
<b>3.2 Charakterisierung gonadenspezifisch exprimierter Gene.....</b>	<b>100</b>
3.2.1 Identifizierung von <i>upstream</i> Interaktionspartnern der Src-Kinase SmTK3.....	101
3.2.1.1 Charakterisierung des EGFR pathway substrate 8-Proteins (SmEps8) .....	101
3.2.1.2 Untersuchung weiterer putativer Protein-Protein-Interaktionen von SmEps8.....	109
3.2.2 Protein-Protein-Interaktionen von SmTK6.....	113
3.2.2.1 Strukturelle Charakterisierung des <i>Discs large</i> Moleküls (SmDLG) .....	113
3.2.2.2 Untersuchungen von putativen <i>Discs large</i> -Interaktionen.....	114
3.2.2.3 Analyse der Expressionsorte von SmScrib und SmLGL.....	117
3.2.2.4 Weitere funktionelle Analysen der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL .....	120
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>122</b>
<b>4.1 <i>In vitro</i> Inhibitorbehandlungen adulter Schistosomen.....</b>	<b>122</b>
4.1.1 Inhibierung der Kinaseaktivität durch den Einsatz von TRIKI .....	122
4.1.2 Vergleichende Untersuchungen der Eiproduktion und mitotischen Aktivität nach vorangegangenen <i>in vitro</i> Inhibitorbehandlungen.....	123
4.1.3 Morphologische Veränderungen adulter Schistosomen durch Inhibitorbehandlungen.....	124

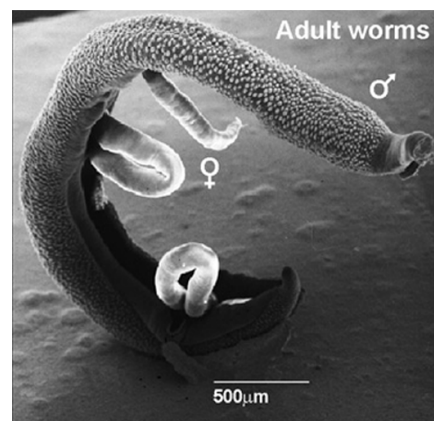
4.1.4	Differentiell transkribierte Gene nach erfolgten Inhibitorbehandlungen.....	126
4.1.4.1	Vergleich differentiell transkribierter Gene nach Stimulation bzw. Inhibition des SmT $\beta$ RI .....	131
4.1.4.2	Differentielle Transkription verschiedener Eischalsynthesegene durch den Einfluss der Signalwege von SmT $\beta$ RI und Src-Tyrosinkinasen .....	132
4.1.5	Ausblick.....	134
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung ausgewählter Signalkaskaden in Reproduktionsorganen .....</b>	<b>136</b>
4.2.1	Identifikation und Charakterisierung von SmEps8 als <i>upstream</i> Interaktionspartner der Src- Kinase SmTK3.....	136
4.2.1.1	Charakterisierung der SmTK3-SmEps8-Interaktion.....	137
4.2.2	Verbindung der SmTK3-Signalkaskade mit der EGFR-Transduktion .....	140
4.2.3	Zukünftige Experimente für die Aufklärung der Funktion von SmEps8.....	142
4.2.4	Identifizierung und Charakterisierung von SmDLG, SmScrib und SmLGL.....	143
4.2.4.1	Weitere putative Interaktionen der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL.....	147
<b>5</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>149</b>
<b>5.1</b>	<b>Alignment der T<math>\beta</math>RI-Moleküle und hierarchische Anordnung differentiell transkribierter Gene der Microarray-Analysen.....</b>	<b>149</b>
5.1.1	Alignment der Vollständigensequenzen der T $\beta$ RI-Moleküle von <i>H. sapiens</i> und <i>S. mansoni</i> .....	149
5.1.2	Hierarchische Anordnungen differentiell transkribierter Gene nach Inhibitorbehandlungen ..	150
<b>5.2</b>	<b>Sequenzen und Alignments verschiedener Moleküle zur Charakterisierung gonadenspezifisch exprimierter Gene .....</b>	<b>152</b>
5.2.1	Sequenzierungsergebnisse der SmEps8-Klone des Y3H-Screenings .....	152
5.2.2	Multialignment verschiedener Eps8-Moleküle .....	153
5.2.3	Sequenzen der EGFR-Moleküle in <i>S. mansoni</i> .....	155
5.2.4	Alignment SmAbi-2 und HsAbi-1 .....	157
5.2.5	Sequenzen der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL .....	158
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>162</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>166</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN .....</b>	<b>184</b>
8.1	Allgemeine Abkürzungen .....	184
8.2	Einheiten .....	187
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>188</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis .....	188
9.2	Tabellenverzeichnis .....	189

<b>10</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>190</b>
<b>11</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....</b>	<b>191</b>
<b>11.1</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>191</b>
<b>11.2</b>	<b>Kongressbeiträge.....</b>	<b>191</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>194</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Humanparasit *Schistosoma mansoni*

Im Jahre 1851 wurde erstmalig der in Mesenterialvenen des Magen-Darm-Trakts parasitierende Helminth *Schistosoma mansoni* von Theodor Bilharz beschrieben (Lucius & Loos-Frank, 1997; Hagan, 2009). Dieser Wurm gehört zur Klasse der Trematoda sowie der Subklasse Digenea und bildet mit anderen Arten wie z.B. *S. haematobium* und *S. japonicum* die Familie der Schistosomatidae. Neben den aufgeführten humanpathogenen Vertretern gibt es veterinärmedizinisch relevante Schistosomenarten, die eine Vielzahl an Wild-, Haus- und Nutztiere befallen können (De Bont & Vercruysse 1998; Quack et al. 2006). Einige Arten, wie z.B. *S. japonicum*, besitzen ein hohes zoonotisches Potential (He et al. 2001). Schistosomen sind die einzigen Vertreter der normalerweise hermaphroditischen Trematoda, deren Adultstadien einen markanten Geschlechtsdimorphismus entwickelt haben (vgl. Abb. 1-1). Ferner zeigen Schistosomen während ihres Lebenszyklus einen ausgeprägten Generations- und Wirtswechsel mit zwei freilebenden Larvenstadien.

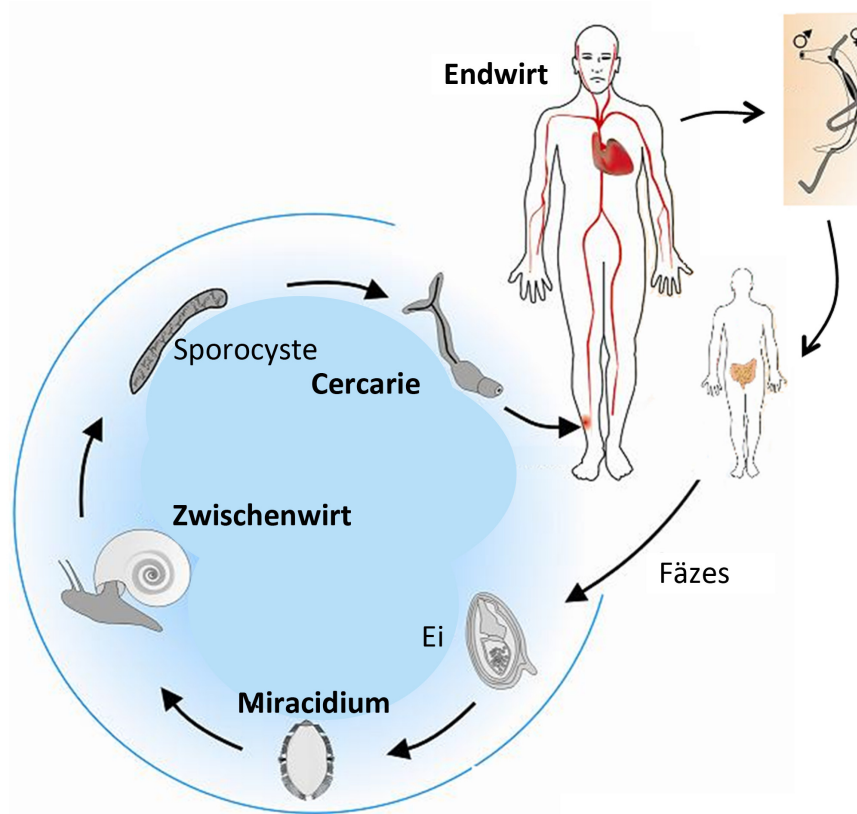


**Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopische Darstellung adulter, gepaarter Schistosomen**

Das muskulösere Männchen (♂) trägt in einer Art Bauchfalte, dem gynäcophoren Kanal, das schlankere aber längere Weibchen (♀). Die beiden Adulten befinden sich dabei in einem dauerhaften Paarungskontakt. *Scale bar*: 500 µm. (modifiziert nach Verjovski-Almeida et al., 2003)

In den Mesenterialvenen des Endwirts parasitieren die dauerhaft gepaarten Adultstadien (Abb. 1-1), wo das Weibchen von *S. mansoni* bis zu 300 Eier pro Tag produziert (Moore & Sandground, 1956). Durch Absonderung lytischer Enzyme penetrieren die Eier das Darmepithel und gelangen wie z.B. im Fall von *S. mansoni* in das Darmlumen und werden mit dem Fäzes ausgeschieden (s. Abb. 1-2; Lucius & Loos-Frank, 1997). Das Ei beinhaltet das erste, freilebende Larvenstadium, das Miracidium (Wimpernlarve). Während der Passage

durch den Darm kommt es im Ei zur Reifung dieser Larve, die nach Ausscheidung induziert durch einen Lichtreiz im Süßwasser aus dem Ei schlüpft. Das Miracidium sucht aktiv nach einem spezifischen Invertebraten-Zwischenwirt, wobei es sich im Fall von *S. mansoni* um eine Süßwasserschnecke der Gattung *Biomphalaria glabrata* handelt. Nach Penetration durch die Schneckenhaut wandelt sich die Larve in eine Muttersporocyste um. In diesem Stadium kommt es durch zahlreiche mitotische Teilungen der in der Muttersporocyste enthaltenen Keimballen zur Bildung von Tochtorsporocysten, aus denen anschließend das zweite freilebende Larvenstadium entsteht. Hierbei handelt es sich um die Cercarie (Gabelschwanzlarve), die den Zwischenwirt aufgrund phototaktischer Reize gruppenweise (hunderte bis tausende Individuen) verlässt. Durch das Wasser schwimmend finden Cercarien Kontakt zu einem Endwirt, in den sie durch Penetration der Haut eindringen. Dabei werfen die Cercarien ihren Gabelschwanz ab, wodurch es zur Transformation zu Schistosomula kommt. Dabei handelt es sich um Präadultstadien, welche in die Venen bzw. das Lymphsystem des Endwirtes gelangen und durch Herz und Lunge wandern. Während der Lungenpassage kommt es zum Längenwachstum der Schistosomula, die anschließend über den linken Herzventrikel in den Blutkreislauf und schließlich ins Pfortadersystem gelangen. Im Zuge ihrer Wanderung reifen Männchen und Weibchen zu adulten Würmern heran. Eine Besonderheit der Schistosomen ist die Ausdifferenzierung der weiblichen Gonaden, welche erst im Zuge des Paarungskontaktes mit den Männchen erfolgt (Kunz, 2001). Die gepaarten Schistosomen gelangen anschließend mit dem Blutstrom weiter in die Mesenterialvenen, in denen sie parasitieren. Nach der vollständigen Reifung des Weibchens produziert dieses nicht-embryonierte Eier als Basis für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus. Anhand der produzierten Eier können morphologische Unterscheidungen der Arten *S. mansoni* (seitlicher Stachel), *S. haematobium* (senkrechter Stachel) und *S. japonicum* (keinen Stachel) getroffen werden (Lucius & Loos-Frank, 1997).



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *S. mansoni***

Der Lebenszyklus von Schistosomen ist durch einen Vertebraten-Invertebraten-Wirtswechsel geprägt. Dabei befinden sich die adulten, gepaarten Würmer in den Mesenterialvenen des Endwirts (z.B. Mensch), in denen sie eine Vielzahl an Eiern produzieren. Diese penetrieren das Epithelium, gelangen anschließend ins Darmlumen und werden mit den Fäzes ausgeschieden. Dabei entwickelt sich das erste Larvenstadium (Miracidium) im Ei, welches im Süßwasser schlüpft und eine Süßwasserschnecke als Zwischenwirt infiziert. Hier kommt es zur Muttersporocystenbildung und anschließender asexueller Vermehrung durch eine Vielzahl mitotischer Teilungen. Die so entstehenden Tochtersporocysten entwickeln sich zum zweiten Larvenstadium (Cercarie), die anschließend in Gruppen die Schnecke verlassen. Durch Penetration der Haut gelangen die Cercarien in einen Endwirt, wobei sie ihren Gabelschwanz verlieren und sich in Schistosomula umwandeln. Diese gelangen über den Blutstrom in Herz und Lunge und von dort weiter über die Pfortader der Leber bis in die Mesenterialvenen des Magen-Darm-Trakts. Während dieser Passage entwickeln sich die Schistosomula zu adulten Männchen und prä-adulten Weibchen. In den Venen angelangt, kommt es zum Paarungskontakt beider Geschlechter, wodurch die sexuelle Reifung des Weibchens induziert wird, welches anschließend Eier produziert. (♂: Männchen; ♀: Weibchen) (modifiziert nach <http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br>)

Etwa die Hälfte der Eier gelangt mit dem Blutstrom in die Milz bzw. Leber des Endwirtes und löst dort das Krankheitsbild der Schistosomiasis oder Bilharziose aus. In den Geweben dieser Organe sezernieren die Eier Antigene (Ashton et al., 2001), welche von Leukozyten erkannt werden und damit zur Aggregation der Immunzellen führen. Diese isolieren die Eier durch Ausbildung von Granulomen, wodurch krankhafte Vergrößerungen der Organe (Hepato- bzw. Splenomegalie) und Leberzirrhosen entstehen können (Ross et al., 2002; Blanchard, 2004). Nach der Malaria handelt es sich bei der Schistosomiasis um die zweithäufigste parasitäre Erkrankung in (sub)tropischen Gebieten (Cioli et al. 1995, Savioli et



al., 1997). In den Endemiegebieten leben 600-780 Millionen Menschen (Chitsulo et al., 2000), von denen jährlich bis zu 230 Millionen infiziert werden (WHO Fact sheet N°115, Januar 2012, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>). Die Mortalitätsrate der Schistosomiasis liegt bei über 200.000 pro Jahr in endemischen Gebieten Afrikas, südlich der Sahara.

Als Medikament der Wahl gegen alle Schistosomenarten wird Praziquantel® (PZQ) eingesetzt (Cioli et al., 1995). Die detaillierte Wirkungsweise des Präparats ist nicht vollständig bekannt, jedoch sind wahrscheinlich Calciumkanäle des Teguments adulter Schistosomen das Hauptziel des Wirkstoffs (Greenberg, 2005; Doenhoff et al., 2009). Obwohl PZQ als Schistosomicid sehr effektiv ist, schützt seine Anwendung nicht vor Reinfektionen und kann Nebenwirkungen hervorrufen wie Schwindel, Kopfschmerz, allgemeines Unwohlsein, Schläfrigkeit, Ermüdung, Nesselfieber und Diarrhö. Großangelegte Gesundheitsprogramme der WHO oder privater Organisationen wie der Bill & Melinda Gates-Stiftung beinhalteten Massenbehandlungen in endemischen Gebieten. Obwohl diese Programme aus ethisch-moralischen Gründen zu befürworten sind, besteht die Gefahr der Resistenzbildung der Schistosomen gegenüber PZQ. Bislang existieren noch keine klinischen Beweise für eine Resistenz, jedoch mehren sich die Hinweise auf eine geringere Empfindlichkeit von Schistosomen bei Behandlung mit PZQ (Liang et al., 2001; Doenhoff et al., 2002; Fenwick & Webster, 2006; Doenhoff et al., 2009; Melman et al., 2009). Aufgrund dieser Hinweise ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe oder alternativer Vakzinierungen notwendig und ein international erkanntes sowie verfolgtes Ziel (Fenwick & Webster 2006; Brindley et al. 2009; Xiao et al. 2010).

## ***1.2 Die sexuelle Reifung des Weibchen als Folge der „Männchen-Weibchen-Interaktion“***

Ein besonderer Schritt zur Erhaltung des Lebenszyklus von Schistosomen ist die paarungsinduzierten Gonadenentwicklung der Weibchen (Kunz, 2001). Bei diesen Differenzierungsprozessen in den Weibchen kommt es zu einer signifikanten Größenzunahme, was es ermöglicht mature/gepaarte, bzw. immature/ungepaarte Weibchen zu unterscheiden, wobei letztere deutlich kleiner sind. Mature Weibchen sind durch unterschiedlich differenzierte Vitellinzellen sowie einem Ovar mit Oogonien und primären Oocyten gekennzeichnet (Erasmus et al., 1982). Die Mehliischen Drüsen, die den Ootyp umgeben, sind ebenfalls vollständig entwickelt. Diese Charakteristika wurden für mature und junge Weibchen mit unterschiedlichen Paarungszeiten und daraus resultierende Reifegraden festgestellt (Erasmus, 1973). Spermien wurden als Auslöser der Differenzierungsprozesse ausgeschlossen, da sich entwickelnde, 32 Tage alte Weibchen bereits Differenzierungsmuster der Reproduktionsorgane zeigten, aber noch nicht

inseminiert waren. Ferner wurde durch Röntgen-Bestrahlungsexperimente gezeigt, dass sich auch mutmaßlich sterile Männchen mit Weibchen paaren und in diesen Differenzierungsprozesse induzieren (Armstrong, 1965). Im Gegensatz dazu enthielten immature Weibchen aus unisexuellen Infektionen lediglich unreife Gonadenanlagen mit stammzellartigen Vorläuferzellen, sowie unvollständig entwickelte Mehlische Drüsen (Erasmus, 1973; Kunz, 2001). Die Vitellinzellen werden während der Differenzierung in 4 Stadien unterschieden (S1-S4; Erasmus et al., 1982). Die Vitellocyten sind dabei im S1-Stadium als undifferenzierte Zellen und im S2-Stadium als sich entwickelnde Zellen mit beginnender Biosyntheseaktivität charakterisiert. Im S3-Stadium besitzen die sich entwickelnden Zellen eine aktive Proteinbiosynthese, S4-Vitellinzellen sind schließlich vollständig entwickelt. Schon früh wurde eine Männchen-abhängige sexuelle Reifung der Weibchen vermutet, welche durch spätere Arbeiten verifiziert wurde (Armstrong, 1965). Zusätzlich ist die Ablagefrequenz der produzierten Eier vom Kontakt mit dem Männchen abhängig (Michaels, 1969). Ferner wurde gezeigt, dass es durch Entpaarung (in einem Zeitraum von 35 Tagen) zur Verringerung der Körpergröße der Weibchen und damit einhergehend zur Regression der Gonaden kommt, wobei dies reversibel ist (Popiel et al., 1984). Durch Untersuchung einzelner Segmente der Männchen konnte festgestellt werden, dass es durch Paarung des Weibchens unabhängig vom Körperabschnitt des Männchens zur lokalen Differenzierung der weiblichen Gonaden kommt (Popiel & Basch, 1984). Durch Einbau von [<sup>3</sup>H]Thymidin konnte eine gesteigerte DNA-Synthese bei der Paarung von immaturren Weibchen mit Männchen gemessen werden, sowie eine verringerte mitotische Aktivität in entpaarten Weibchen (Den Hollander & Erasmus, 1985). Die Bereiche mit der größten mitotischen Aktivität wurden dabei in Vitellarium und Ovar des Weibchens lokalisiert (Den Hollander & Erasmus, 1984). Eine aktuelle Studie zeigte, dass eine Balance zwischen der Zellproliferation und dem programmierten Zelltod von Vitellocyten existiert (Galanti et al., 2012). Dabei wurde im Vitellarium des Weibchens in Abwesenheit des Männchens eine erhöhte Apoptoserate festgestellt, die möglicherweise zur fehlenden Entwicklung der Organe führt, anstatt zu einer verringerten Proliferation der organspezifischen Zellen.

Neben der DNA-Synthese reguliert das Männchen die Expression verschiedener weibchenspezifischer Gene, wie die Eischalvorläufergene p14, p19 und p48 (Kunz et al., 1995; Köster et al., 1988; Michel et al., 2003; Chen et al., 1992). Dabei nimmt die Transkriptionsrate dieser Gene bereits innerhalb von 3 Tagen nach Entpaarung ab, die komplette Reduktion der Transkription erfolgt nach 6 Tagen in Abwesenheit des Männchens. Im Gegensatz dazu ist die Transkription anderer Gene, deren Expression in beiden Geschlechtern nachgewiesen wurde (z.B. Cathepsin L, Proteindisulfidisomerase, PDI), nicht vom Paarungskontakt mit dem Männchen abhängig (Grevelding et al., 1997). In einer der ersten Transkriptomstudien wurden differentiell regulierte Gene maturer und immaturer

Schistosomen identifiziert (Fitzpatrick & Hoffman, 2006). Zu den differentiell transkribierten Genen adulter Schistosomenweibchen (mature, bzw. immature) gehörten u.a. solche, die für Proteine der Eischalsynthese kodieren. Durch diese Transkriptomstudien wurden Hinweise erbracht, dass nicht alle diese Gene durch die Paarung mit dem Männchen reguliert werden. Ferner wurden mittels der SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*)-Methode differentiell transkribierte Gene von immaturen und maturen Weibchen identifiziert (Cogswell et al., 2012). Von diesen konnte eine Vielzahl in den Vitellocyten sowie dem Vitellarium in den maturen Weibchen lokalisiert werden. Diese Ergebnisse wiesen auf eine Männchen-induzierte Reifung der weiblichen Gonaden hin.

Damit das Männchen die Reifung des Weibchens induzieren kann, muss ein Signal vom Männchen an, bzw. in das Weibchen gelangen. Die Art des Signals ist bislang unklar, jedoch wurden verschiedene Hypothesen zu diesem Sachverhalt aufgestellt und untersucht. Als ein möglicher Stimulus wurde ein taktiler Reiz postuliert, jedoch verworfen, da gezeigt werden konnte, dass *S. mansoni*-Weibchen durch Paarung mit Männchen anderer Gattungen unterschiedliche Differenzierungsstadien der Gonaden aufwiesen (Kunz, 2001). Ein taktiler Reiz würde jedoch keine Spezies-Spezifität erreichen. Die Befruchtung mit Spermien als Stimulus wurde ebenfalls ausgeschlossen, da man zwischen maturen/gepaarten und jungen/gepaarten Weibchen unterscheiden kann und in beiden Fällen unabhängig von der Präsenz der Spermien Gonadenentwicklungsmuster im Weibchen nachweisen konnte (Erasmus, 1973). Eine Stimulation in Form eines chemischen Reizes (z. B. ein sekretiertes Hormon oder Protein) scheint wahrscheinlicher zu sein (Kunz, 2001). Zu diesen Substanzen könnten Acetone, Glucose oder Cholesterin gehören, von denen ein Transport zwischen Männchen und Weibchen nachgewiesen wurde. Als ein mögliches Protein mit Einfluss auf die Paarung von *S. japonicum* wurde das Glycoprotein SjGCP identifiziert (Cheng et al., 2009). Dieses Protein wird im Tegument zum gynaecophoren Kanal der Männchen exprimiert (Gupta & Basch, 1987; Bostic & Strand, 1996), jedoch ist seine Funktion bislang nicht bekannt. Unabhängig vom eigentlichen Stimulus wurde weiterführend postuliert, dass es im Weibchen nach der Stimulation durch das Männchen über verschiedene Signaltransduktionswege zu Proliferations- und Differenzierungsprozessen in den Gonaden kommt. Dabei wurde eine hohe Konservierung der beteiligten Gene vermutet, von denen ähnliche Moleküle in *S. mansoni* kloniert und charakterisiert worden sind (Kunz, 2001; LoVerde, 2002; Knobloch et al., 2007; LoVerde et al., 2009; Beckmann et al., 2010a).

### **1.3 Identifikation von Signaltransduktionsmolekülen bei *Schistosoma mansoni***

Prozesse der Signaltransduktion sind für Metazoa obligatorisch, um schnell auf verschiedene Umwelteinflüsse zu reagieren (Krauss, 2008). Dafür wird eine Vielzahl von

Signalwegen zur Transduktion externer Signale sowie zur inter- und intrazellulären Kommunikation genutzt. Des Weiteren verfügen mehrzellige Organismen über spezialisierte Gewebestrukturen, deren Funktionen koordiniert und reguliert werden müssen. Die Regulation des Gewebes erfolgt über die Anzahl, Morphologie, Lokalisation und Funktion einzelner Zellen. So erfolgt die Erfassung von Umweltveränderungen in Metazoa meist über sensorische Zelltypen, welche empfangene Informationen umwandeln und diese an benachbarte Zellen weiterleiten. Eine interzelluläre Kommunikation kann über extrazelluläre Botenstoffe wie Hormone oder *second messenger* (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ), *gap junctions*, Oberflächenproteine oder elektrische Signale (beispielsweise an Synapsen) erfolgen. Nach interzellulärer Weiterleitung wird das Signal prozessiert und über eine Signalkaskade intrazellulär weitergeleitet, um anschließend in der Zelle den Metabolismus, die Aktivität der Zellteilung, die Morphologie oder die Transkription bestimmter Gene zu regulieren. Dabei existieren zwei Möglichkeiten, um das Signal in die Zelle zu leiten. Zum einen kann das Signal an der Zellmembran durch Transmembranrezeptoren erkannt werden, zum anderen ist die Passage eines Botenstoffes in die Zelle und dessen Erkennung durch cytoplasmatische Rezeptoren möglich. In beiden Fällen erfolgt nach der Aktivierung des Rezeptors eine Weiterleitung des Signals in Form von Aktivierungen weiterer, *downstream* gelegener Signalproteine.

Da verschiedene Signalmoleküle innerhalb des Tierreiches eine hohe Konservierung aufweisen, wurden bereits viele in *S. mansoni* identifiziert (LoVerde et al., 2007; Knobloch et al., 2007; Beckmann et al., 2010a; You et al., 2011). Durch die Veröffentlichung des Genoms von *S. mansoni* und anderer humanpathogener Arten der Schistosomatidae wurde das Spektrum vorhandener Signalmoleküle des Parasiten deutlich vergrößert (Berriman et al., 2009; Protasio et al., 2012; *Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium, 2009; Young et al., 2012). In den nachfolgenden Unterkapiteln werden identifizierte Moleküle des TGF $\beta$ -Signalwegs und der Klasse der Tyrosinkinasen (TK) detailliert vorgestellt, da diese von besonderem Interesse in dieser Arbeit waren.

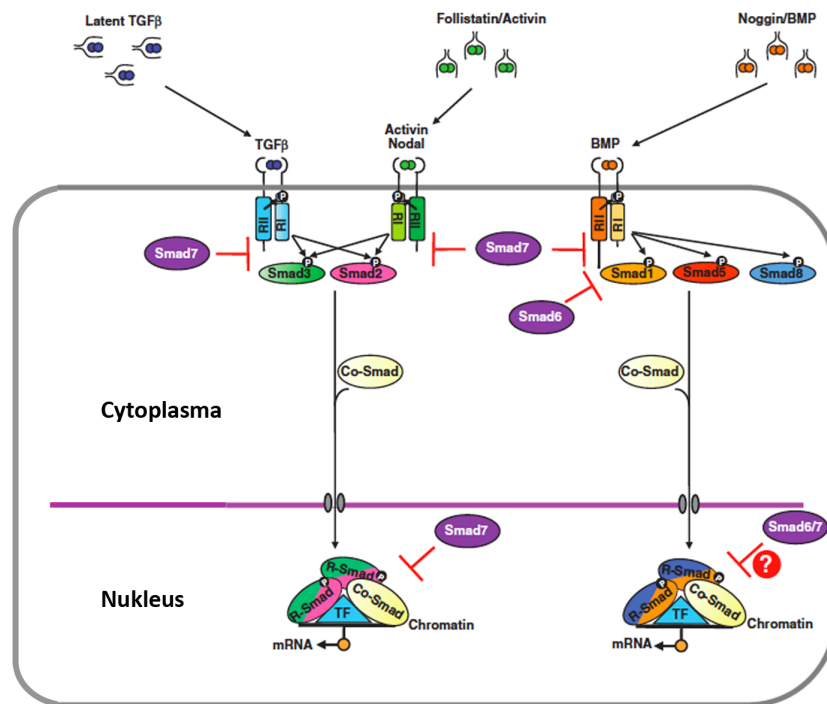
### 1.3.1 Der TGF $\beta$ -Signalweg von *Schistosoma mansoni*

Der hoch konservierte *Transforming Growth Factor beta* (TGF $\beta$ )-Signalweg, dessen beteiligte Moleküle bei einer Vielzahl von Organismen bereits beschrieben wurden, beinhaltet Cytokine der TGF $\beta$ -Familie als Liganden (s. Abb. 1-3; Massagué, 2000). Diese Liganden sind kleine Polypeptide und werden in zwei Subfamilien unterteilt: die TGF $\beta$ -/Activin-/Nodal-Familie und die BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)-/GDF (*Growth and Differentiation Factor*)-/MIS (*Müllerian Inhibiting Substance*)-Familie (Shi & Massagué, 2003). Eine Bindung der Liganden erfolgt durch Transmembranrezeptoren, welche ebenfalls in zwei Typen (Typ I- und Typ II-Rezeptoren) unterschieden werden (s. Abb. 1-3). Die Liganden bilden Dimere und werden zunächst durch zwei Typ II-Rezeptoren gebunden, welche die

Typ I-Rezeptoren rekrutieren, wodurch ein heterotetramerer Rezeptor-Liganden-Komplex entsteht (Moustakas & Heldin, 2009). Beide Rezeptortypen sind Serin/Threonin-Kinasen, die sich sowohl strukturell als auch in ihrem Aktivitätszustand unterscheiden (Wrana et al., 1994). Der Typ II-Rezeptor ist permanent phosphoryliert, im Gegensatz zum nicht phosphorylierten und damit inaktiven Typ I-Rezeptor (Wrana et al., 1994; Shi & Massagué, 2003). Daneben beinhaltet der Typ I-Rezeptor eine spezifische Aminosäuresequenz von Glycin- und Serinresten, dem so genannten GS-Motiv, welches unmittelbar hinter der Transmembrandomäne lokalisiert ist. Im inaktiven Zustand des Rezeptors kommt es zur Ausbildung einer spezifischen Konformation, in der sich das keilförmig-angeordnete GS-Motiv gegen die Kinasedomäne drückt, deren aktives Zentrum verschiebt und folglich die Aktivität des Rezeptors blockiert (Massagué, 2000). Zusätzlich kann das Immunophilin FKBP12 (FK506 Bindeprotein 12) an das GS-Motiv binden, wodurch die inaktive Konformation des Rezeptors weiter stabilisiert wird (Huse et al., 1999).

Nach Ausbildung des Liganden-Rezeptorkomplexes phosphoryliert der Typ II-Rezeptor Reste der Aminosäuren Serin (Ser, S) und Threonin (Thr, T) innerhalb des GS-Motivs des Typ-I-Rezeptors, wodurch dieser aktiviert wird (Wrana et al., 1994; Wieser et al., 1995). Der aktivierte Typ I-Rezeptor phosphoryliert seinerseits das C-terminal gelegene Motiv SSxS spezifischer Rezeptor-assoziiierter Proteine, den R-Smads (wobei x jeder beliebigen Aminosäure entspricht; s. Abb. 1-3; Massagué, 2000). Diese Moleküle besitzen zwei konservierte Domänen, die N-terminale MH1 und die C-terminale MH2 (MH = Mad Homologie), welche über einen variablen *Linkerbereich* verbunden sind. Durch Phosphorylierung des R-Smads löst sich dieses Molekül vom Rezeptor sowie von seinen cytoplasmatischen Ankern und bindet das Co-Smad4 (Common-Smad; Shi & Massagué, 2003). Der R-Smad-Smad4-Komplex wird in den Nukleus transportiert, in dem er über die MH1-Domänen an die DNA und über die MH2-Domäne verschiedene Co-Transkriptionsfaktoren bindet (Shi & Massagué, 2003). Auf diese Weise ist die Transkriptionsregulation verschiedener Gene möglich, wobei, abhängig vom Zelltypus durch den Smad-Komplex ein unterschiedliches Repertoire an Co-Faktoren gebunden wird. Nach erfolgter Transkriptionsregulation ist der Rücktransport des R-Smads ins Cytoplasma möglich oder auch eine Markierung mit Ubiquitin für die anschließende Degradierung (Shi & Massagué, 2003). Entsprechend der Liganden werden die R-Smads funktionell unterteilt in R-Smads des TGF $\beta$ -/Activin-Signalwegs (Smad 2 und 3) oder des BMP-Signalwegs (Smad 1, 5 und 8; Massagué, 2000). Neben den R- und Co-Smads existieren im humanen System weitere Smad-Moleküle mit inhibierender Funktion und werden als I-Smads (*inhibitory Smads*) bezeichnet. Zu diesen gehören Smad 6 und 7 (vgl. Abb. 1-3; von Bubnoff & Cho, 2001).

Eine weitere, übergeordnete Ebene der Regulation dieses Signalwegs stellen lösliche Antagonisten der Liganden dar. Zu diesen gehören unter anderem das Latenz-assoziierte Protein (LAP), Follistatin, Noggin und Chordin (vgl. Abb. 1-3; Massagué, 2000; Moustakas & Heldin, 2009). Diese Antagonisten blockieren die Cytokine der TGF $\beta$ -Familie noch bevor diese an entsprechende Rezeptoren binden können und blockieren somit die Ausbildung der Liganden-Rezeptor-Komplexe und letztendlich die entsprechenden TGF $\beta$ -Signalwege.



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung von TGF $\beta$ -Signalwegen**

Die Unterteilung der TGF $\beta$ -Signalwege erfolgt anhand der Liganden TGF $\beta$ , Activin und BMP, die durch bestimmte Antagonisten wie das Latenz-assoziierte Protein (Latent), Follistatin und Noggin spezifisch gebunden werden können. Ohne Antagonisten werden die Liganden durch die Typ I/II-Rezeptoren gebunden, einhergehend mit der Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors. Im Anschluss werden die R-Smads 2 und 3 (durch T $\beta$ RI bzw. Activin/Nodal-RI) bzw. 1, 5 und 8 (durch BMP-Rezeptor I) gebunden und ebenfalls phosphoryliert. Die aktivierten R-Smads binden anschließend Co-Smad (4), wodurch der Transport in den Nukleus bewirkt wird. Dort kommt es zur Bindung an die DNA und über weitere an diesen Komplex bindende Transkriptionsfaktoren (TF) zur Genexpression. Als inhibitorische Smads wurden Smad 6 und 7 identifiziert. Smad 7 bindet im Cytoplasma an intrazelluläre Regionen der Rezeptoren und im Nukleus den Smad-Komplex. Smad 6 hingegen bindet im Cytoplasma das Smad 1, spielt aber vielleicht eine zusätzliche Rolle im Nukleus. (modifiziert nach Moustakas & Heldin, 2009)

TGF $\beta$ -Signalwege sind an Prozessen zur Regulation von Proliferationsvorgängen, Differenzierung und Zelltod sowie Adhäsion und Migration beteiligt, wobei diese u.a. vom Zelltyp und vom Differenzierungszustand der Zelle abhängen (Moustakas & Heldin, 2009). Häufig wird durch TGF $\beta$  die Proliferation von Zellen inhibiert, jedoch ist auch eine

Proliferationsstimulation möglich (Yang & Moses, 2008). TGF $\beta$ -Signaltransduktionsprozesse besitzen eine sehr hohe Konservierung innerhalb des Tierreichs, sowohl funktional als auch auf Ebene der beteiligten Moleküle. Daher konnten durch Datenbankvergleiche Gene mit hohen Sequenzübereinstimmungen zu Mitgliedern der TGF $\beta$ -Signalwege im Genom von *S. mansoni* identifiziert werden, einzige Ausnahme ist der schistosomale TGF $\beta$ -Ligand, der bislang nicht gefunden wurde.

Der Parasit besitzt jedoch Liganden mit Ähnlichkeit zu BMP und zu Activin, bzw. Inhibin (Freitas et al., 2009; Freitas et al., 2007). Transkripte des SmBMP (Smp\_146790; *Accession* Nr. EU684544) wurden in Eiern, Cercarien sowie in dem Adultstadium unabhängig vom Geschlecht über RT-PCR detektiert (Freitas et al., 2009). Zusätzlich wurde das Protein mittels Western Blot-Analyse bei Männchen und Weibchen gefunden, jedoch stärker exprimiert in Männchen. Daneben wurde SmBMP anhand von Immunlokalisationen in den Protonephridien des Männchens lokalisiert und eine Exkretion dieses Polypeptids identifiziert. Daher wurde eine Interaktion von SmBMP mit BMP-spezifischen Rezeptoren des Wirts postuliert. Der zweite Ligand der TGF $\beta$ -Familie im Parasitengenom ist SmInhibinActivin (SmInAct, Smp\_063190, *Accession* Nr. DQ863513; Freitas et al., 2007). Transkripte dieses Gens wurden in den Eiern sowie im Männchen und im Weibchen gefunden, in denen das Protein ebenfalls exprimiert wird, jedoch nur in den paarungserfahrenen Adultstadien. Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen wurden Transkripte in den Reproduktionsorganen des Weibchens, Vitellarium und Ovar, sowie dem Subtegument des Männchens nachgewiesen. Aufgrund dieses Musters wurde der Einfluss von SmInAct auf die Eiproduktion sowie die Embryogenese angenommen und untersucht (Freitas et al., 2007). Dafür wurde SmInAct posttranskriptionell mittels RNA-Interferenz (RNAi) supprimiert. Ein Effekt auf die Eiproduktion konnte nicht festgestellt werden. Allerdings wurde eine Unterbindung der Eientwicklung während der Embryogenese beobachtet, woraus eine wichtige Rolle des SmInAct während der Embryogenese des Parasiten geschlossen wurde.

Neben diesen Liganden wurden verschiedene Rezeptoren der TGF $\beta$ -Familie bereits vor Beendigung des Genomprojekts für *S. mansoni* beschrieben. Zwei Studien befassten sich mit einem identifizierten Typ II-Rezeptor der Serin/Threonin-Kinasen (Forrester et al., 2004; Osman et al., 2006). Forrester et al. (2004) beschrieben zwei Isoformen von SmRK2 (Smp\_080120.x; *Accession* Nr. AY550912 für SmRK2 und AY285784 für SmRK2a) sowie eine trunkierte Form (SmRK2b), die jeweils hohe Übereinstimmungen zu Activin Typ II-Rezeptoren aufzeigten. Weiterhin wurden die Transkriptions- und Expressionsmuster untersucht, wobei Transkripte des Gens SmRK2 in adulten Schistosomen und Schistosomula vorkommen. Die Expression des Proteins konnte im Tegument und Parenchym beider Geschlechter lokalisiert werden. Diese Lokalisation an der Oberfläche des Parasiten implizierte dessen mögliche Bindung an das Wirtscytokin. Osman et al. (2006) identifizierten

zwei ESTs (*expressed sequence tags*; CD126244 und CD069595) mit der gleichen Genidentitätsnummer und führten weitere Studien durch. Dazu gehörte die Untersuchung der Genstruktur, wobei gezeigt wurde, dass das Gen durch alternatives Spleißen zwei verschiedene Isoformen der Typ II-Rezeptoren generiert. Durch Sequenzvergleiche konnten diese den Activin-Rezeptoren (SmRK2) und den TGF $\beta$ -Rezeptoren (SmT $\beta$ RII) zugeordnet werden. Ferner konnte eine Koloalisation beider Rezeptoren sowie die zusätzliche Expression von SmT $\beta$ RII in den Saugnäpfen des Parasiten und im Epithelium des Ösophagus festgestellt werden (Osman et al., 2006). Die Transkription von SmT $\beta$ RII wurden für alle Stadien des Lebenszyklus von *S. mansoni* detektiert, wobei sich eine Lokalisation in den Adultstadien auf die Vitellinzellen, das Darmepithel und das Subtegument beschränkte. In Form von Ligandenbindungsassays wurden bei Stimulation mit hTGF $\beta$  eine Interaktion von SmT $\beta$ RI und SmT $\beta$ RII sowie eine Signalweiterleitung an SmSmad2 und dessen Interaktion mit SmSmad4 festgestellt. Als weiteren Effekt der hTGF $\beta$ -Stimulation wurde eine Erhöhung der Expression des gynaecophoren Kanal-Proteins SmGCP (Smp\_212719; *Accession* Nr. AAC47216) gemessen, wodurch dieses als ein Zielmolekül des TGF $\beta$ -Signalwegs in *S. mansoni* identifiziert werden konnte (Osman et al., 2006). Anhand dieser Ergebnisse wurde dem TGF $\beta$ -Signalweg eine besondere Rolle bei der Männchen-induzierten Gonadendifferenzierung des Weibchens zugesprochen.

Aufgrund seiner Übereinstimmung zu den humanen Typ I TGF $\beta$ -Rezeptoren wurde SmRK1 (SmT $\beta$ RI; Smp\_049760; *Accession* Nr. AF031557) identifiziert (Davies et al., 1998). Dieses Protein besitzt alle typischen Strukturmerkmale dieser Rezeptorklasse, wird von einem *single-copy* Gen kodiert und Immunlokalisierungen zufolge im Tegument der Männchen exprimiert. Durch zusätzliche *in situ*-Hybridisierungen wurden Transkripte von SmT $\beta$ RI im Parenchym, sowie in den Vitellinzellen und Oocyten detektiert (Knobloch et al., 2004). Mit Hilfe von Immunoblots wurde die Expression von SmT $\beta$ RI in den Adultstadien, nicht aber in den Larvalstadien oder den Eiern bestimmt (Davies et al., 1998). Diese Ergebnisse korrelierten mit denen von RT-PCRs dieser Studie, in denen Schistosomula und Adultstadien untersucht wurden. Daneben wurden funktionelle Studien in Form von Bindungsassays der Liganden hTGF $\beta$  und hBMP7 durchgeführt (Beall & Pearce, 2001), wobei eine Bindung zwischen hTGF $\beta$  und SmT $\beta$ RI festgestellt wurde. Weiterhin wurde eine Phosphorylierung des schistosomalen Smad2-Moleküls durch eine konstitutiv aktive Variante des SmT $\beta$ RI identifiziert. Bei Co-Expression des SmSmad2 und SmT $\beta$ RI wurde darüber hinaus eine Verstärkung der Aktivität nach Stimulation mit hTGF $\beta$  festgestellt, jedoch nicht mit hBMP7. Des Weiteren befasste sich eine neue Studie mit transkriptionellen Veränderungen nach Stimulation adulter Schistosomen mit hTGF $\beta$  unter Verwendung eines parasitenspezifischen Microarrays (Oliveira et al., 2012). Bei diesen Versuchen wurden 381 Gene als hTGF $\beta$ -reguliert identifiziert, deren Identität für Funktionen in den Bereichen Morphologie, Entwicklung und Zellzyklus sprechen.



In den vorhandenen Genom- und Transkriptionsdaten von *S. mansoni* wurden neben den soeben beschriebenen Rezeptoren weitere Vertreter der TGF $\beta$ -Familie identifiziert (Andrade et al., 2011; Protasio et al., 2012). Dazu gehören unter anderem Rezeptoren der Activin- und BMP-Familie, sowie Follistatin und Noggin als Antagonisten der Liganden. Für diese Moleküle wurden bislang keine charakterisierenden Studien durchgeführt, daher beruhen die entsprechenden Annotationen ausschließlich auf Datenbankvergleichen.

Wie im humanen System wurde auch im Parasitengenom ein Protein mit Sequenzübereinstimmung zu dem Immunophilin FKBP12 identifiziert (Smp\_079230; Accession Nr. AY118110; Rossi et al., 2002). Dieses Protein konnte sowohl in Männchen als auch in Weibchen, sowie Eiern, Cercarien und Schistosomula durch Western Blot-Analysen identifiziert werden. Durch *in situ*-Hybridisierungen wurde eine Kolo-kalisierung von SmFKBP12 und SmT $\beta$ RI in den Reproduktionsorganen des Weibchens gefunden (Knobloch et al., 2004). Weiterhin wurde das Protein durch Immunlokalisation in den Vitellinzellen, Oocyten, sowie dem Tegument und Parenchym beider Geschlechter der adulten Parasiten bestimmt. Anhand von *Yeast 2 Hybrid* (Y2H)-Arbeiten konnte schließlich eine direkte Interaktion von SmFKBP12 und SmT $\beta$ RI nachgewiesen werden (Knobloch et al., 2004).

Mit Hilfe einer RT-PCR mit degenerierten Primern war es darüber hinaus schon vor der Fertigstellung des Genomprojekts möglich, die schistosomalen Smad-Moleküle SmSmad1 und SmSmad2 zu amplifizieren (Smp\_013060; Accession Nr. AF215933, bzw. Smp\_085910; Accession Nr. AF215934; Beall et al., 2000). Deren Transkription wurde im Schistosomulumstadium während der Lungenpassage und im Adultstadium gezeigt. Für SmSmad2 wurde zudem eine alternative Spleißvariante identifiziert (Accession Nr. AF232025; Osman et al., 2001) und dessen Protein in den Tuberkeln des Teguments, dem Parenchym beider Geschlechter, dem Ovar und Vitellarium des Weibchens, im embryonierten Ei sowie den Testes des Männchens lokalisiert. Diese Ergebnisse korrelierten mit denen von *in situ*-Hybridisierungen. Weiterhin wurde eine konstitutive Transkription von SmSmad2 in allen Entwicklungsstadien von *S. mansoni* detektiert. Mit SmSmad1B konnte ein weiteres R-Smad Molekül gefunden werden (Smp\_160650; Accession Nr. AY666164; Carlo et al., 2007), das Sequenzvergleichen zufolge große Ähnlichkeit zu Smads des BMP-Signalweges aufwies. Dieses Gen zeigte die höchste Expression in Cercarien, wird jedoch auch in den anderen Lebendstadien von *S. mansoni* transkribiert. Immunlokalisationen zeigten das SmSmad1B-Protein im Parenchym und den weiblichen Reproduktionsorganen. Als Co-Smad konnte SmSmad4, welches in den verschiedenen Stadien des Lebenszyklus detektiert wurde, identifiziert werden (Smp\_033950; Accession Nr. AY371484; Osman et al., 2004). SmSmad4 wird in adulten Schistosomen in Epithelzellen um den Darm, den Vitellin- und Muskelzellen sowie dem Subtegument exprimiert. Als Co-Smad zeigte dieses Molekül Interaktionen mit SmSmad1, SmSmad1B und SmSmad2, *in vivo* und *in vitro* (Osman et al., 2004; Carlo et al., 2007). Im Zuge von Interaktionsstudien mit dem SmT $\beta$ RI stellte sich heraus, dass die

Interaktionen von SmSmad2 und SmSmad4 bei gleichzeitiger Expression des Rezeptors am stärksten waren, wodurch eine funktionelle Einteilung der R-Smad-Moleküle von *S. mansoni* möglich war. In dieser Einteilung stellt SmSmad2 einen Vertreter des TGF $\beta$ -Signalwegs dar. Die Moleküle SmSmad1 und SmSmad1B gehören zu den R-Smads des BMP-Signalwegs.

Auf der Grundlage dieser vielseitigen Studien konnte die hohe Konservierung der Moleküle des TGF $\beta$ -Signalweges für *S. mansoni* gezeigt werden und auf Basis der Lokalisationsstudien wurden erste Hinweise auf deren Funktionen erhalten.

### 1.3.2 Tyrosinkinasen von *Schistosoma mansoni* mit Funktionen in den Gonaden

Neben Molekülen des TGF $\beta$ -Signalweges stellen auch Proteintyrosinkinasen (PTK) hoch konservierte Signalmoleküle dar. Sie werden generell unterteilt in Rezeptor-tyrosinkinasen (RTKs) und zelluläre Tyrosinkinasen (CTKs). RTKs katalysieren die Phosphorylierung von Tyrosinresten definierter Substratmoleküle und spielen wichtige Rollen bei Zellmigration, Zellzyklus, Metabolismus, Zellproliferation und Differenzierung (Schlessinger, 2000). Diese Moleküle bestehen im Wesentlichen aus drei strukturell wichtigen Bereichen, der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und dem intrazellulären Bereich. Letzterer beinhaltet eine Tyrosinkinase(TK)-domäne und regulatorische Elemente. Eine Zuordnung der RTKs erfolgt funktional anhand ihrer Liganden, z.B. *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), Insulin Rezeptor (IR) oder *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR). Meist liegen RTKs als Monomere in der Zellmembran vor, dimerisieren nach Ligandenbindung und zeigen im Anschluss eine *in trans* Autophosphorylierung (Krauss, 2008). Diese bewirkt eine allosterische Konformationsänderung der Kinasedomäne, wodurch die Bindung einer Vielzahl von intrazellulären Signalmolekülen erfolgt.

Als mögliche *downstream* Interaktionspartner verschiedener RTKs wurden CTKs gefunden, wozu u.a. Vertreter der Src-, Janus-, oder Abl-Kinasen gehören (Hubbard & Till, 2000). Src-Kinasen stellen mit neun Mitgliedern die größte Subfamilie der CTKs dar und sind beispielsweise an Signaltransduktionsprozessen der Mitose und der Restrukturierung des Cytoskeletts beteiligt (Thomas & Brugge, 1997). CTKs weisen verschiedene Domänen für Protein-Protein-, Protein-DNA- oder Protein-Lipid-Interaktionen auf, u.a. Src Homologie (SH)2- und SH3-Domänen. Die SH2-Domäne bindet sequenzspezifisch an phosphorylierte Tyrosinreste und die SH3-Domäne an prolinreiche Sequenzen. Wie auch die RTKs besitzen die CTKs eine katalytisch aktive TK-Domäne, welche durch eine intramolekulare Bindung durch die SH2-Domäne inaktiviert wird (Superti-Furga & Courtneidge, 1995).

Wie auch für Moleküle des TGF $\beta$ -Signalwegs wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von verschiedenen PTKs in *S. mansoni* identifiziert. Diese machen rund 1,9% der

kodierten Proteine des Parasitengenoms aus und konnten in 15 RTKs und 19 CTKs unterteilt werden (Andrade et al., 2011). Die RTKs beinhalten 2 IRs, 4 EGFRs, 2 VKRs (*Venus Flytrap Kinase Receptor*), jeweils einen Rezeptor der Familie der Ephrin(Eph), Ror, CCK4(Colon Carcinoma 4), MUSK(*Muscle-spezifische Kinase*)-Rezeptoren, sowie drei Unbekannte.

Bei den beiden IRs handelt es sich um SmIR-1 (Smp\_009990; *Accession* Nr. AF314754) und SmIR-2 (Smp\_074030; *Accession* Nr. AY649844), zwei Rezeptoren mit unterschiedlichen Expressionsmustern. So wurde SmIR-1 in den Muskeln, dem intestinalen Epithel und der Basalmembran von Männchen und Weibchen lokalisiert, SmIR-2 hingegen im Parenchym beider Adultstadien. Darüber hinaus wurde die Transkription für SmIR-1 hauptsächlich in Cercarien und Schistosomula detektiert, SmIR-2 Transkripte wurden für alle Stadien des Lebenszyklus gefunden (Khayath et al., 2007).

Von den vier identifizierten EGFRs wurde ein Molekül (SER; Schistosome EGFR; Smp\_093930.x; *Accession* Nr. M86396) sowie dessen alternative Spleißvarianten bereits charakterisiert (Ramachandran et al., 1996; Shoemaker et al., 1992). Dabei konnte gezeigt werden, dass entwicklungsabhängige C-terminal trunkierte SER-Transkripte existieren, die durch alternatives Spleißen entstehen. SER wurde in Cercarien und in den Adultstadien beschrieben, wobei das Protein in den Muskeln der Adulten lokalisiert war. In diesen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass SER eine katalytisch aktive Kinasedomäne besitzt, die zur Phosphorylierung von Tyrosinresten führt (Ramachandran et al., 1996). Ferner gelang der Nachweis einer SER-Aktivierung durch den humanen EGF-Liganden (hEGF). Gleichzeitig wurde ein Anstieg der DNA- und Proteinsynthese sowie der Proteinphosphorylierung festgestellt (Vicogne et al., 2004). Aufgrund dieser Effekte wurde eine Wirts-EGF-induzierte Regulation der Parasitenentwicklung postuliert, wie auch im Vorfeld für die Bindung von hTGFβ beschrieben.

Des Weiteren wurden zwei VKRs in *S. mansoni* identifiziert. Bei diesen speziellen RTKs handelt es sich um Rezeptoren, die eine extrazelluläre Bindedomäne besitzen, die strukturelle Ähnlichkeit zu *Venus Flytrap*-Modulen von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren aufweist. Hingegen zeigt die intrazelluläre TK-Domäne hohe Ähnlichkeit zu denen von IRs (Ahier et al., 2009). Dementsprechend sind diese beiden Moleküle atypische Vertreter der RTKs, die hauptsächlich in Invertebraten identifiziert wurden. SmVKR1 (ehemals SmRTK1, Smp\_019790; *Accession* Nr. AF101194) wird in allen Stadien des Lebenszyklus transkribiert. *In situ*-Hybridisierungen zeigten Transkripte hauptsächlich im Parenchym der Männchen sowie den Oocyten im Ovar und Oviduct der Weibchen, aber auch in Miracidien (Vicogne et al., 2003). SmVKR2 (Smp\_153500; *Accession* Nr. GU270860) wird ebenfalls in allen Stadien des Lebenszyklus transkribiert, wobei eine deutlich stärkere Transkription dieses Gens in den Larvenstadien, hauptsächlich den Cercarien, detektiert worden ist (Gougnard et al., 2012).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beide VKRs deutlich mehr in Weibchen transkribiert werden als in Männchen (SmVKR1 2,6-fach und SmVKR2 4,4-fach mehr). Die katalytische Aktivität der Kinasen wurde im *Xenopus laevis* Oocyten-System überprüft, wobei eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung der Kinase gefunden wurde und  $\text{Ca}^{2+}$  somit als potentieller Ligand in Frage kommt. Weitere RTK-Familien wurden im Kinom anhand von phylogenetischen Analysen identifiziert, wobei für diese bislang keine Charakterisierungen vorliegen (Andrade et al., 2011).

Als eine der ersten CTKs in *S. mansoni* wurde die Fyn/Src-ähnliche Tyrosinkinase SmTK5 (Smp\_136300; *Accession* Nr. AF232691) mittels einer RT-PCR mit degenerierten Primern identifiziert (Kapp et al., 2001). Wie andere Mitglieder der Src-Tyrosinkinasefamilie besitzt SmTK5 eine N-terminal lokalisierte SH4-Domäne, gefolgt von einer SH3-Domäne und einer SH2-Domäne, die mit der katalytischen TK-Domäne verbunden ist. SmTK5 ist ein *single-copy* Gen und wird in beiden Adult- sowie den Larvenstadien transkribiert. In *in situ*-Hybridisierungen lokalisiert dieses Gen in allen Reproduktionsorganen, dem Parenchym, Tegument sowie der Gastrodermis adulter Würmer (Knobloch et al., 2002a).

Als ein weiteres Mitglied der Familie der Src-TKs wurde SmTK3 (Smp\_151300; *Accession* Nr. AJ585205) entdeckt (Kapp et al., 2004). Sie besitzt einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie SmTK5, jedoch mit höherer Sequenzübereinstimmung zu Src-TKs. Einzigartig im Vergleich zu anderen Src-Kinasen ist der Sequenzabschnitt zwischen der SH4- und der SH3-Domäne, weshalb dieser Bereich als *unique-site* bezeichnet wird. Auch SmTK3 ist ein *single-copy* Gen, dessen Transkription in beiden Larvenstadien (Miracidien und Cercarien) und den Adultstadien unabhängig von der Paarungserfahrung nachgewiesen wurde. *In situ*-Hybridisierungen und Immunolokalisationsstudien zeigten, dass SmTK3 in den Vitellocyten, Oocyten, Spermatocyten und dem Parenchym exprimiert wird. Mit Hilfe von einem Genbankscreening in einer Hefebank, die auf Basis von cDNA adulter Würmer beider Geschlechter kloniert worden war, konnten Interaktionspartner dieser Kinase identifiziert werden (Quack et al., 2009). Für diese Experimente wurde die *unique-site* und die angrenzende SH3-Domäne verwendet, und u.a. ein Protein mit Ähnlichkeit zur BAF60-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes (*Accession* Nr. AAC52794) als stärkster Interaktionspartner identifiziert. Eines der am häufigsten gefundenen Interaktionspartner war ein Protein ähnlich zum Diaphanous 3 (SmDia, *Accession* Nr. NM\_019670). Durch weiterführende Y2H-Experimente konnte für SmDia gezeigt werden, dass es die Rho GTPase SmRho1 bindet (Quack et al., 2009). Durch Interaktion von SmTK3 an SmDia und dessen Interaktion an SmRho1 wurde die Verbindung beider Signalwege postuliert. Daneben sind Formine wie Diaphanousproteine an der Organisation des Cytoskeletts beteiligt, weshalb Quack et al. (2009) vermuteten, dass diese Signalwege diese Prozesse in den Reproduktionsorganen von *S. mansoni* regulieren.

Im Zuge von Y2H-Experimenten zur Identifizierung von Partnern einer schistosomalen Syk-TK wurde eine weitere Src-TK identifiziert, SmTK6 (Smp\_006920; *Accession* Nr. FN397679, Beckmann et al., 2010b). Struktur- und Datenbankanalysen zeigten, dass dieses Molekül Src-Familien-typische Strukturelemente aufweist wie je eine SH3-, SH2- und TK-Domäne. Letztere offenbarte jedoch auch Ähnlichkeiten zu TK-Domänen von Abl-Kinasen, was SmTK6 als potentielle Src/Abl-Hybridkinase einzigartig macht (Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2011). So fehlen die SH4-Domänen Myristylierungsmotive sowie einer von zwei Src-TK-spezifischen, regulatorischen Tyrosinresten (Tyr 416 innerhalb der katalytischen Domäne). Dafür findet sich ein zusätzlicher Tyrosinrest innerhalb der katalytischen Domäne der SmTK6 an Position 312. Beides, das Fehlen von Tyr 416 sowie die Präsenz von Tyr 312, ist typisch für Abl-Kinasen. Dennoch zeigt SmTK6 auch Src-spezifische Sequenzmotive innerhalb der TK-Domäne sowie innerhalb der SH3- und SH2-Domänen, weshalb diese Kinase als Src-/Abl-Hybrid-TK eingestuft wurde. Die funktionelle Unterteilung als Hybridkinase konnte zusätzlich durch *Germinal Vesicle Breakdown* (GVBD)-Experimenten im *Xenopus*-Oocyten-System bestimmt werden (vgl. Abschnitt 1.4.2; Beckmann et al., 2011). Mittels Y2H-Analysen konnten *upstream* Interaktionspartner des Moleküls identifiziert werden (Beckmann et al., 2011). Dazu gehörten ein transmembranes Mucinhomolog (Smp\_161910; *Accession* Nr. XP\_002578516), die Src-Tyrosinkinase SmTK3, ein Tumorsuppressorprotein mit Ähnlichkeit zum *Discs large*-Protein (SmDLG, Smp\_170290; *Accession* Nr. XP\_002579880) sowie weitere Proteine ohne signifikante Übereinstimmungen zu anderen Proteinsequenzen in verfügbaren Datenbanken. Des Weiteren zeigten Beckmann et al. (2011), dass SmTK6 in der Lage ist, mit der atypischen RTK SmVKR1 zu interagieren. *In situ*-Hybridisierungen lokalisierten Transkripte im Parenchym beider Geschlechter, im Ovar sowie den Testes und möglicherweise im Vitellarium (Beckmann et al., 2010b).

Als Vertreter der Syk-TKs ist SmTK4 (Smp\_149460; *Accession* Nr. AJ421472) identifiziert worden (Knobloch et al., 2002a). Mittels Sequenzanalyse wurden als charakteristische Strukturelemente für Syk-Kinasen eine TK- und zwei SH2-Domänen gefunden. Erneut handelt es sich um ein *single-copy* Gen, dessen Transkription in allen Lebensstadien von *S. mansoni* detektiert wurde, unabhängig von der Paarungserfahrung adulter Parasiten. Des Weiteren wurden SmTK4-Transkripte in den Gonaden beider Geschlechter lokalisiert, mit Ausnahme des Vitellariums, sowie in einigen parenchymatischen Zellen. In ersten funktionellen Studien in Form von RNAi mit spezifischen dsRNAs gegen SmTK4 wurden in Männchen eine deutlich reduzierte Anzahl an Spermien, sowie fast ausschließlich unreife Spermatocyten in der Samenblase identifiziert (Beckmann et al., 2010b). Daneben wurde in den Weibchen eine erhöhte Anzahl an murenen Oocyten im Ovar ermittelt. Mit Hilfe von cDNA-Bankscreenings konnten sowohl *up-* als auch *downstream* Interaktionen von SmTK4 identifiziert werden (Beckmann et al., 2010b). Unter Verwendung der Tandem SH2-Domäne wurden als *upstream* Interaktionspartner SmTK6 und SmTK3 in

diesem Y3H-Screening identifiziert. *Downstream* Interaktionspartner der SmTK4 wurden in einem ähnlichen cDNA-Bankscreening mit dem Linkerbereich (zwischen SH2-SH2 und TK-Domäne) gekoppelt mit der TK-Domänensequenz identifiziert, wobei es sich um ein MAPK-aktivierendes Protein PM20/PM21 (*Accession* Nr. NP\_001108072) und ein Mapmodulin (*Accession* Nr. NP\_001097361) handelte. Auf Basis dieser Ergebnisse sowie den Lokalisationsdaten wurde die Hypothese eines trimeren Kinasekomplexes aufgestellt, der in den Gonaden von *S. mansoni* an Differenzierungsprozessen beteiligt ist. Sowohl die Verbindung des SmTK3-Signalwegs mit SmRho1 über SmDia als auch des SmTK4-Signalwegs mit einem MAPK-aktivierenden Protein und einem Mapmodulin identifizierten Signaltransduktionspartner bekannter Funktionen, welche in Verbindung mit dem Kinasekomplex vermutlich an der Regulation der Organisation des Cytoskelett in schistosomalen Gonaden beteiligt sind (Beckmann et al., 2010b).

Anhand der Genomdaten zu *S. mansoni* konnten zusätzlich zwei Vertreter der Abl-Kinasefamilie gefunden werden, SmAbl1 (Smp\_169230 und Smp\_169240; *Accession* Nr. FN582311) und SmAbl2 (Smp\_128790; *Accession* Nr. FN582311) (Beckmann et al., 2010c). Im Gegensatz zu dem Src-/Abl-Hybrid SmTK6, zeigen diese beiden Kinasen den typischen Aufbau von Abl-Kinasen. Ein Vergleich beider Moleküle machte deutlich, dass sie zueinander nur zu 24% identisch sind, wobei 67% der TK-Domänen-Sequenzen exakt übereinstimmen. Mittels *in situ*-Hybridisierungen wurde gezeigt, dass die Transkripte beider Kinasen in umgebenden Zellen des Ootyps, Ovar, Vitellarium, Testes, Parenchym und Gastrodermis vorhanden sind.

Für viele dieser Moleküle wurde eine Beteiligung an Differenzierungsprozessen der Gonaden gemutmaßt, die Prozesse der Eiproduktion beeinflussen. Aufgrund der pathogenen Eigenschaften der Eier ist es von Interesse, deren Produktion zu unterbinden. Daher wurden in der Vergangenheit bereits einige Studien mit Präparaten der humanen Krebstherapie zur Blockierung der vorgestellten, hoch konservierten Signalmoleküle durchgeführt, mit dem Ziel, langfristig eine alternative Medikation gegen Schistosomen zu entwickeln (Dissous et al., 2007; Dissous & Grevelding, 2011; Beckmann et al., 2012a).

### **1.4 Anwendung kommerzieller chemischer Inhibitoren *in vitro***

Für die Untersuchung physiologischer und morphologischer Änderungen von adulten Schistosomen durch Applikation von chemischen Inhibitoren hat sich die über viele Jahre etablierte *in vitro* Kultur bewährt (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007; Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2010c; Beckmann et al., 2012a). Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass sich adulte Schistosomen unter *in vitro* Bedingungen paaren und Eier produzieren (Basch, 1981). Daneben ist es möglich, paarungsabhängige transkriptionelle

Änderungen adulter Würmer zu untersuchen, da auch *de novo*-Transkription *in vitro* stattfindet (Grevelding et al., 1997).

Bei der Auswahl geeigneter Inhibitoren wurden bislang Komponenten bevorzugt verwendet, welche hoch konservierte Proteine inhibieren, wie z.B. Signaltransduktionsproteine (Knobloch et al. 2007; Beckmann et al., 2012a). Dabei handelt es sich u.a. um Substanzen, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, um die Aktivität von z.B. Protoonkogenen zu unterdrücken. Dieses Kapitel soll einen Einblick über bereits verwendete Inhibitoren und deren Einfluss auf verschiedene schistosomale Zielmoleküle geben. Dabei stehen Inhibitoren für Mitglieder des TGF $\beta$ -Signalwegs und verschiedener PTKs im Fokus. Die meisten PTK-Inhibitoren wirken als ATP-Kompetitoren im aktiven Zentrum von Kinasen und behindern dadurch die ATP-Übertragung auf die entsprechenden Substrate. Des Weiteren werden die Substanzen unterschieden zwischen denen, die an eine aktive, offene Konformation des Zielbereichs binden und solchen, die eine inaktive, geschlossene Konformationen bevorzugen (Beckmann et al., 2012a).

Als Syk-TK-Inhibitoren wurden in der Vergangenheit zwei verschiedene Komponenten eingesetzt (Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2012a). Dabei handelt es sich zum einen um Piceatannol (Enzo Life Science), welches in einer Konzentration von 70  $\mu$ M zu einer um 50% verringerten Eiproduktion innerhalb einer Woche sowie morphologischen Veränderungen führte, die denen aus dem RNAi-Versuch mit dsRNAs gegen SmTK4 entsprachen (s. Kapitel 1.3.2). Die Inhibitorbehandlung führte zu einer erhöhten Anzahl maturer Oocyten sowie einer verringerten Zahl Oogonien und keinen reifen Spermien in den Testes der Männchen (Beckmann et al., 2010b). Um die spezifische Wirkung von Piceatannol auf SmTK4 zu testen, wurde dessen Kinaseaktivität unter Zugabe des Inhibitors in dem *Xenopus*-Oocyten-System getestet. Dabei wurde ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M eine vollständige Blockierung der Kinase durch fehlendes Auslösen eines GVBDs identifiziert (Beckmann et al., 2010b). Zum anderen wurde der Inhibitor BAY 61-3606 (Enzo Life Science) als weiterer Syk-Kinaseinhibitor eingesetzt (Beckmann et al., 2012a). Dabei wurden mit Konzentrationen von 10 nM und 1  $\mu$ M ebenfalls verringerte Eiproduktion festgestellt sowie morphologische Veränderungen, die denen der zuvor genannten Piceatannol-Behandlung entsprachen.

Ein weiteres Beispiel für einen erfolgreich eingesetzten Inhibitor mit Auswirkung auf adulte Schistosomen ist der Abl-Kinase-Inhibitor Imatinib (Glivec®; STI-571, Novartis; Beckmann et al., 2010c). Nach einer Behandlung adulter Parasiten mit unterschiedlichen Konzentrationen dieses Wirkstoffs (0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) und Behandlungszeiträumen bis zu 96h *in vitro* nahmen jeweils dosis- und zeitabhängig die Paarungsstabilität ab und die Mortalität zu (Beckmann et al., 2010c). Des Weiteren traten morphologische Veränderungen innerhalb der Reproduktionsorgane auf, wie eine Vielzahl apoptotischer

Zellen und eine reduzierte Differenzierung. Zusätzlich war die Gastrodermis stark betroffen und lag größtenteils vom Parenchym losgelöst, bzw. vollständig kollabiert vor. Wie auch die physiologischen Effekte wurden diese morphologischen Veränderungen abhängig von der Dosis und Zeit ausgelöst.

Die beiden für diese Arbeit wichtigen Inhibitoren werden im Folgenden detailliert und separat vorgestellt.

### 1.4.1 Der TGF $\beta$ RI Kinase-Inhibitor (TRIKI)

Bei TRIKI (HTS-466284, LY-364947; C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>; Calbiochem; CAS 396129-53-6) handelt es sich um einen pyrazolbasierten Inhibitor [3-(Pyridin-2-yl)-4-(4-chinonyl)-1H-pyrazol] (vgl. Abb. 1-4). Diese zellpermeable Komponente ist ein ATP-Kompetitor der Kinasedomäne vom Säuger T $\beta$ RI mit einem IC<sub>50</sub> von 51 nM (Sawyer et al., 2003). Im Zuge einer Bindung kommt es zur Stabilisierung der Konformation des inaktiven Rezeptors und zur Unterbrechung von T $\beta$ RI-vermittelten Signalprozessen (Singh et al., 2003). Durch eine gezielte Mutation eines Serinrests (S280), in dessen Folge es zur konstitutiven Aktivierung des T $\beta$ RI kommt, besitzt der Inhibitor eine verringerte Wirkung (Ogunjimi et al., 2012). Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu$ M ist TRIKI eine potente, nichttoxische Substanz für eukaryotische Zellkulturen und beeinflusst nicht deren Viabilität. Bereits ab einer Konzentration von 27 nM unterbindet TRIKI die Autophosphorylierung des T $\beta$ RI (Singh et al., 2003). Weiterhin inhibiert TRIKI mit einem IC<sub>50</sub> von 47 nM das TGF $\beta$ -abhängige zelluläre Wachstum von Mausfibroblasten (IC<sub>50</sub> = 89 nM) sowie die Transkriptionsaktivität von Nerzlungenzellen.

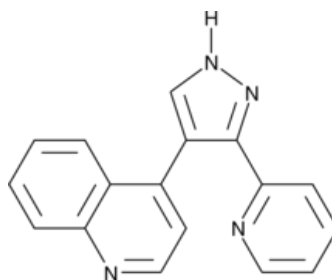


Abbildung 1-4: Strukturformel des verwendeten ATP-Kompetitors TRIKI

Dieser Wirkstoff fand bereits erfolgreich Verwendung für *in vitro* Studien mit adulten Schistosomen (Knobloch et al., 2007). Dabei wurde eine dosierungsabhängige Reduktion der mitotischen Aktivität von inhibitorbehandelten Weibchen durch den Einbau von Bromodesoxyuridin (BrdU) gemessen. Ferner konnte eine verringerte Eiproduktion nach Behandlung mit dem Inhibitor bereits nach einer Behandlungsdauer von 2 Tagen, ebenfalls



in Abhängigkeit der verwendeten Konzentration (150 nM und 300 nM), festgestellt werden. Eine Auswirkung auf die Stabilität des Paarungskontaktes der Parasiten wurde jedoch nicht festgestellt. Aufgrund dieser physiologischen Veränderungen inhibitorbehandelter Weibchen wurde ein Einfluss von SmTβRI auf Differenzierungsprozesse des Weibchens, einschließlich der Eiproduktion, postuliert (Knobloch et al., 2007).

#### 1.4.2 Herbimycin A

Herbimycin A (Herb A;  $C_{30}H_{42}N_2O_9$ ; Enzo Life Science; CAS-Nummer: 70563-58-5) ist ein zellpermeables Antibiotikum, welches ursprünglich aus *Streptomyces* sp. MST-AS5386 isoliert wurde (vgl. Abb. 1-5; Omura et al., 1979). Fukazawa et al. (1991) zeigten erstmals eine spezifische Inhibition von CTKs durch den Einsatz von Herb A, die später genauer charakterisiert wurde (Uehara et al., 1989a; Uehara et al., 1989b). So kommt es bei höheren Temperaturen zu einer Herb A-verursachten ( $IC_{50} = 0,9 \mu M$  in Zellkultur) Konformationsänderung der humanen Src-Kinase  $p60^{v-Src}$  in Form einer irreversiblen Bindung des Antibiotikums an einen Cysteinrest im C-Terminus der Kinase. Daneben bindet Herb A das *Heat shock protein* 90 (Hsp90) und bewirkt dadurch eine Destabilisierung anderer Proteine, wie v-Src, deren korrekte Proteinfaltung durch Hsp90 unterstützt wird (Blagosklonny, 2002). Dementsprechend wurde Herb A als Inhibitor verschiedener CTKs aber auch als Inhibitor der Chaperonaktivität von Hsp90 charakterisiert (Kasai & Kikuchi, 2010). Durch den Einsatz von Herb A konnte eine inhibierte Proliferation von verschiedenen Karzinomazellen *in vitro* detektiert werden (Farivar et al., 2003), wobei dies wahrscheinlich durch eine Suppression von Cyclin D und dem anschließenden Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase verursacht wurde (Blagosklonny, 2002).

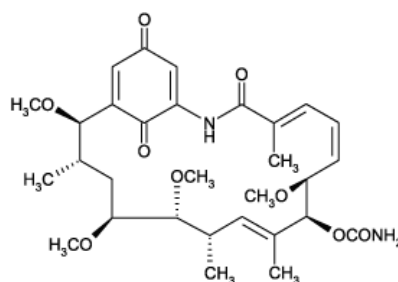


Abbildung 1-5: Strukturformel des verwendeten Inhibitors für Src-Tyrosinkinasen, Herbimycin A

Wie auch für TRIKI wurde Herb A bereits für eine *in vitro* Kultivierung von adulten Schistosomen eingesetzt (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007). Dabei konnte ein Einfluss dieses Src-Kinase-Inhibitors auf die DNA-Synthese gefunden werden. So wurde die

mitotische Aktivität dosierungsabhängig (0,9  $\mu\text{M}$ , 1,8  $\mu\text{M}$ , 4,5  $\mu\text{M}$  und 9  $\mu\text{M}$ ) reduziert (Knobloch et al., 2006). Zusätzlich wurden Erhöhungen der Transkript- und Proteinmengen von p14 gemessen. Weiterhin wurde eine 40-60% ige Verringerung der Eiproduktion innerhalb von 24 h ermittelt. Neben diesen physiologischen Effekten konnten eine verringerte Tyrosinphosphorylierung sowie eine Destabilisierung der Src-Tyrosinkinase SmTK3 festgestellt werden. Für den Behandlungszeitraum von 24 h wurden weder Beeinträchtigungen der Paarungsstabilität noch der mitotischen Aktivität der Männchen gefunden.

Da die Inhibitoren TRIKI und Herb A ähnliche physiologische Effekte in Schistosomenweibchen verursachten, wurde weiterhin der Effekt der Kombination beider Inhibitoren untersucht (Knobloch et al., 2007). Im Vergleich zu den Einzelbehandlungen wurde hierbei die stärkste Reduktion der mitotischen Aktivität sowie der Eiproduktion festgestellt.

Ferner wurde der Einfluss von Herb A auf die Kinaseaktivität von SmTK3, SmTK6 und SmAbl1 im *Xenopus*-Oocyten-System überprüft (Beckmann et al., 2011). In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass die Src-Kinase SmTK3 bereits ab einer Inhibitorkonzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  vollständig inhibiert wurde. Im Vergleich dazu wurde die Src-/Abl-Kinase SmTK6 erst ab einer Herb A-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  vollständig inhibiert, im Gegensatz zu SmAbl1, die selbst bei dieser Konzentration noch eine Aktivität von 60% zeigte.

### **1.5 Das Genom und Transkriptom von *S. mansoni***

Im Jahr 2009 wurde erstmalig das vollständig sequenzierte Genom des Parasiten *S. mansoni* veröffentlicht und später aktualisiert (Berriman et al., 2009; Protasio et al., 2012). Das Genom besitzt eine Größe von 364,5 Mb und besteht aus 885 *Scaffolds*, wobei ca. 40% repetitive Sequenzen darstellen. Für 81% des Genoms konnte eine eindeutige Zuordnung zu den Chromosomen erfolgen, wobei Schistosomen sieben autosomale und zwei geschlechtsbestimmende Chromosomen (W und Z) besitzen. Bereits in der Vergangenheit wurde in Weibchen ein heterogametischer Karyotyp (WZ) festgestellt und bei Männchen ein homogametischer (ZZ) (Short & Grossman, 1981). Dabei beinhalten die W-spezifischen *Scaffolds* nicht-kodierende Gene, der Z-spezifische *Scaffold* im Vergleich dazu insgesamt 782 Gene, wobei ca. 95% *single-copy* Gene darstellen. Für die identifizierten Gene wurde eine ungewöhnliche Introngröße ermittelt, wobei die 5'-Introns kürzer als die 3'-Introns sind (Berriman et al., 2009). Über diese Introngröße erfolgt möglicherweise eine transkriptionelle Regulation. Für 45 Gene wurden Sequenzübereinstimmungen zur Familie der sogenannten

*micro exon genes-* (MEG) identifiziert, die durch eine häufige Anzahl an alternativen Spleißprozessen gekennzeichnet sind.

Anhand von Transkriptom-Analysen wurde eine Gesamtzahl von 10852 proteinkodierenden Genen für den Parasiten identifiziert (Protasio et al., 2012). Für die Prozessierung der RNA wurden sowohl *cis*- als auch *trans*-Spleißprozesse festgestellt, wobei ca. 11% der RNA durch *trans*-Spleißen entstehen. Alternatives Spleißen erfolgt sowohl in *cis* als auch in *trans*. In der Vergangenheit wurden bereits Transkriptom-Analysen in Form von Microarray- oder SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*)-Ansätzen durchgeführt (Oliveira et al., 2009; Williams et al., 2007). So wurden u.a. differentiell transkribierte Gene adulter Schistosomen oder der Larvalstadien untersucht (Fitzpatrick & Hoffmann, 2006; Parker-Manuel et al., 2011). Des Weiteren wurde mit Hilfe von Microarray-Analysen der Einfluss von Cytokinen wie hTGF $\beta$  und TNF $\alpha$  auf verschiedene Stadien des Lebenszyklus des Parasiten untersucht (Oliveira et al., 2012; Oliveira et al., 2009). Dementsprechend stellen Transkriptom-Analysen in Form von Microarrays oder SAGE geeignete Methoden zur Untersuchung von transkriptionellen Unterschieden dar.

## 1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit

Nach der Identifizierung verschiedener Src-Tyrosinkinasen und Moleküle des TGF $\beta$ -Signalwegs zeigten erste funktionelle Arbeiten mit adulten Schistosomen *in vitro* einen Einfluss beider Signalwege auf die Eiproduktion sowie die DNA-Syntheserate (Knobloch, J. et al., 2006; Knobloch, J. et al., 2007). Dabei wurden die Würmer mit den Inhibitoren TRIKI und Herb A, einzeln oder in Kombination, behandelt und anschließend eine dosisabhängige Reduktion der Ovipositionsrate bzw. der mitotischen Aktivität beobachtet, welche einer additiven Wirkung bei Kombination der Inhibitoren unterlag.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten detaillierte morphologische Untersuchungen adulter Schistosomen, die zuvor mit TRIKI, Herb A oder der Kombination beider Inhibitoren behandelt wurden, durchgeführt werden. Für diese Experimente sollten die Schistosomen für unterschiedliche Expositionszeiten mit diesen Inhibitoren *in vitro* kultiviert und auf morphologische Veränderungen ausgewertet werden. Im Fokus dieser Untersuchungen sollten zunächst die primären Transkriptionsorte putativer Zielgene stehen, dabei vor allem die weiblichen Reproduktionsorgane Ovar und Vitellarium, da *in vitro* eine stark verringerte Eiproduktion beobachtet wurde (Knobloch et al., 2007). Daneben sollten auch weitere Gewebe der Parasiten auf mögliche Veränderungen untersucht werden.

Neben diesen Analysen sollte das Transkriptionsprofil entsprechender inhibitor-behandelter Schistosomen analysiert werden. Für die Identifizierung differentiell

transkribierter Gene sollten Microarray-Analysen durchgeführt werden. Ein Ziel hierbei war, Gene mit transkriptioneller Regulation durch SmT $\beta$ RI- und Src-TK-vermittelte Signalwege zu identifizieren. Daneben standen Gene im Fokus, die durch beide Signalwege reguliert werden. Dementsprechend sollten insgesamt drei einzelne Microarray-Analysen mit RNA aus TRIKI-, Herb A- oder TRIKI/Herb A-behandelten Schistosomenweibchen durchgeführt werden. Ausgehend von den zuvor beobachteten physiologischen Veränderungen, wie beispielsweise die reduzierte mitotische Aktivität inhibitorbehandelter Weibchen (Knobloch et al. 2007), wurde erwartet, Gene mit (putativer) Funktion für die Eiproduktion bzw. mitotische Prozesse zu identifizieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten gonadenspezifisch transkribierte Gene charakterisiert werden. Dabei standen Interaktionspartner der Tyrosinkinasen SmTK3 bzw. SmTK6 im Fokus der Untersuchungen, die bereits im Vorfeld über Y2H-Experimente entdeckt worden waren (Buro et al., in Vorbereitung; Beckmann et al., 2011). Für die Charakterisierung dieser Gene sollten verschiedene Methoden wie RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen zur Identifizierung der Transkriptionsprofile genutzt werden. Daneben standen erste funktionelle Analysen in Form von weiterführenden Y2H-Experimenten im Mittelpunkt der Charakterisierung. Ferner sollten Funktionsanalysen mittels RNAi durchgeführt werden. Als Ziel dieser Experimente sollten die Signalwege der cytoplasmatischen Tyrosinkinasen SmTK3 und SmTK6 weiter aufgeklärt werden, deren Einfluss auf die Entwicklung der Reproduktionsorgane bereits postuliert wurde.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit Chemikalien der Firmen Sigma Aldrich, Merck, Carl Roth und Serva hergestellt.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung	Verwendungszweck
10x Probenpuffer:	50% Sucrose; 0,6% Orange G; in 1x TAE-Puffer	DNA-Elektrophorese
1x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	DAPI/BrdU-Methode
AFA-Fixativ	2% Essigsäure; 3% Formaldehyd; 95% EtOH (70%)	Fixierung von Schistosomen
Blockierungslösungen:	4% <i>blocking reagent</i> (Roche) in Maleinsäurepuffer verdünnt 1x Roti Block in dH <sub>2</sub> O verdünnt (Carl Roth)	<i>In situ</i> -Hybridisierung DAPI/BrdU-Methode
Bouin-Fixativ:	15% gesättigte Pikrinsäure; 5% Formaldehyd; 1% Essigsäure; in DEPC-dH <sub>2</sub> O	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Carminrot-Lösung	500 mg Carmine (Certistain, Merck); 500 µl konz. HCl; 500 µl dH <sub>2</sub> O; 90% EtOH ad 20 ml	Carminrot-Färbung von Schistosomen
Denhardt's (100x):	2x SSC; 2% Ficoll; 2% Polyvinylpyrrolidon; 2% BSA; in dH <sub>2</sub> O; filtriert	<i>In situ</i> -Hybridisierung
DEPC-dH <sub>2</sub> O:	0,1% Diethylpyrocarbonat in dH <sub>2</sub> O; autoklaviert	RNA-Isolation; <i>In situ</i> -Hybridisierung
DMSO:	100% Dimethyl-Sulfoxid	Lösungsmittel
Ethidiumbromid:	1 g auf 100 ml dH <sub>2</sub> O	Anfärbung von Nukleinsäuren
Fast Red:	4-Chlor-2-methylbenzendiazonium (Sigma); 5 mg in 5 ml Substratpuffer	<i>In situ</i> -Hybridisierung
LiAc-Lösung (10x):	1 M Lithiumacetat (Sigma); pH 7,5; autoklaviert	Hefetransformation
Lösung I:	0,2 M Tris; pH 7,5	DAPI/BrdU-Methode
Lösung II:	0,2 M Tris; 0,2 M Natriumsulfat; pH 7,5	DAPI/BrdU-Methode
Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5; in DEPCdH <sub>2</sub> O	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Modifizierter Elektroporationspuffer nach siPORT™ siRNA	120 mM Trehalose; 20 mM HEPEs; 1 mM myo-Inositol; 1 mM KCl; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 mM Gluthation; pH 6,9 ± 0,3; Konduktivität <1,3 mS	Elektroporation adulter Schistosomen
MOPS-Puffer (10x):	200 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS); 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; in DEPC-H <sub>2</sub> O (pH 7,0); autoklaviert	RNA-Elektrophorese
Naphthol-AS-Phosphat:	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClNO <sub>5</sub> P (Sigma); 1mg in 20 µl DMSO	<i>In situ</i> -Hybridisierung
ONPG-Lösung:	σ-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG, Sigma); 4 mg/ml in Z-Puffer	β-Galaktosidase-Flüssigkultur-Assay
PEG-Lösung:	50% PEG 3350 (Polyethylenglycol); in dH <sub>2</sub> O	Hefetransformation
Phenol:	Phenol, abgesättigt mit gleichem Volumen 0,5 mM Tris/HCl; pH 7,8	Aufreinigung von Nukleinsäuren
Proteinase K-Puffer:	100 mM Tris (pH 8,0); 50 mM EDTA; pH 8; autoklaviert	<i>In situ</i> -Hybridisierung
RNA-Loading-Puffer:	900 µl Formamid (deionisiert); 100 µl MOPS-Puffer (1x); 160 µl Formaldehyd; 20 µl Bromphenolblau (1% in DEPC-dH <sub>2</sub> O); 20 µl Xylencyanol (1% in DEPC-dH <sub>2</sub> O); 10 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl)	RNA-Elektrophorese
SSC (20x):	3 M NaCl; 0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat · 2H <sub>2</sub> O; pH 7,0; autoklaviert	<i>In situ</i> -Hybridisierung

## Material und Methoden

Substratpuffer:	100 mM Tris/Cl; pH 8,0; autoklaviert	<i>In situ</i> -Hybridisierung
TAE-Puffer (50×):	242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); dH <sub>2</sub> O ad 1 l	DNA-Elektrophorese
TE-Lösung (10×):	0,1 M Tris-HCl; 10mM EDTA; pH 7,5; autoklaviert	Hefetransformation
TESPA/Aceton-Gemisch:	10 ml TESPA (3-Amino-propyltriethoxysilan, Sigma) auf 500 ml Aceton	Silikonisierung von Objektträger für <i>in situ</i> -Hybridisierung
TFB1-Puffer:	12,1 g RbCl; 9,9 g MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O; 2,9 g Kalium-Acetat; 1,1 g CaCl <sub>2</sub> ; 50 ml Glycerol; dH <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 5,8; sterilfiltriert	Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen
TFB2-Puffer:	2,1 g MOPS; 1,2 g RbCl; 8,3 g CaCl <sub>2</sub> ; 150 ml Glycerol; dH <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 6,8 (mit KOH einzustellen); sterilfiltriert	Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen
X-Gal-Stocklösung:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal) in N,N-dimethyl-formamid (DMF); 20 mg/ml	β-Galaktosidase Filterassay
Z-Puffer:	16,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 5,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O; 0,75 g KCl; 0,246 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; dH <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 7,0; autoklaviert	β-Galaktosidase Assay
Z-Puffer/X-Gal-Lösung:	100 ml Z-Puffer; 0,27 ml β-Mercaptoethanol; 1,67 ml X-Gal-Stocklösung	β-Galaktosidase Filterassay

### 2.1.2 Medien und Zusätze

Für die vorliegende Arbeit wurden die folgenden Medien und Zusätze verwendet:

Medium/ Zusatz	Zusammensetzung	Verwendungszweck
Aminosäuren (Merck; Sigma):	Adenin (20 mg/l), L-Histidin (20 mg/l), L-Leucin (100 mg/l), L-Lysin (30 mg/l), L-Methionin (20 mg/l), L-Tryptophan (20 mg/l), Uracil (20 mg/l);	Zusätze zu dem SD-Medium und den SD-Platten für Hefen
Ampicillin:	Ampicillin-Trihydrat [D(-)-α-Aminobenzylpenicillin]; Stockkonz.: 100 mg/ml dH <sub>2</sub> O (sterilfiltriert); Endkonz.: 100 µg/ml	Zusatz zu LB-Medium und LB-Platten für Wachstumsselektion von <i>E. coli</i>
Antibiotikum/Antimycotikum-Lösung (PAA):	10.000 Units/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin; 25 µg/ml Amphotericin B; 0,9% NaCl	Kulturmedium für <i>S. mansoni</i>
HEPES:	1 M 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure; pH 7,4; sterilfiltriert	Kulturmedium für <i>S. mansoni</i>
IPTG:	Isopropylthiogalactosid; 0,1 M in dH <sub>2</sub> O	Blau-Weiß-Selektion von <i>E. coli</i>
LB-Agar:	Angestzt wie LB-Medium; zusätzlich 18 g/l Bactoagar; autoklaviert	<i>E. coli</i> -Medium
LB-Medium:	10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O (pH 7,5); autoklaviert	<i>E. coli</i> -Medium
M199 (Gibco):	10,43 g M199; 1 g Glucose; 2,2 g NaHCO <sub>3</sub> ; 20 ml Tris (1 M; pH 7,4); dH <sub>2</sub> O ad 1 l (pH 7,0); sterilfiltriert	Kulturmedium für <i>S. mansoni</i>
NCS:	Deutsch für Serum von neugeborenen Kälbern (Sigma)	Kulturmedium für <i>S. mansoni</i>
Perfusionsmedium (Gibco):	1% M199 Pulvermedium; 2% (v/v) 0,5 M Tris/HCl	Hamster-Perfusion

	(pH 7,4); 0,1% Glukose; Heparin (Endkonz.: 10 mg/l)	
Schistosomen-Kulturmedium:	M199; 1% HEPES; 1% ABAM; 10% NCS	Kulturmedium für <i>S. mansoni</i>
Schneckenwasser:	Auf 1 l: 3 ml Lösung I (11 g CaCl <sub>2</sub> ; 7 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O; dH <sub>2</sub> O ad 200 ml); 2 ml Lösung II (0,6 g K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 4,6 g NaHCO <sub>3</sub> ; dH <sub>2</sub> O ad 200 ml); 0,4 ml Lösung III (0,6 M NaOH)	Kulturmedium von <i>Biomphalaria glabrata</i>
SD-Agar:	Angesetzt wie SD-Medium; zusätzlich 20 g/l Agar; autoklaviert	Kulturplatten mit Minimalmedium für Hefen
SD-Medium:	6,7 g/l Yeast Nitrogene Base (Gibco); 20 g Glucose; ad 1 l dH <sub>2</sub> O; autoklaviert	Flüssiges Minimalkulturmedium von Hefen
X-Gal:	Stock: 2% in Dimethylformamid	Blau-Weiß-Selektion von <i>E. coli</i>
YPD-Medium:	20 g/l Peptone; 10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Glucose; ad 1 l dH <sub>2</sub> O; autoklaviert	Flüssiges Vollmedium von Hefen
YPD(A)-Platten:	Angesetzt wie YPD-Medium; zusätzlich 20 g/l Agar; autoklaviert	Vollmedium als Kulturplatten für Hefen
YPDA-Medium:	20 g/l Peptone; 10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Glucose; ad 1 l dH <sub>2</sub> O; autoklaviert; (zusätzlich 15 ml steriler 0,2%ige Adenin-Hemisulfat-Lösung; Endkonzentration 0,003%)	Flüssiges Vollmedium von Hefen

Für die Inhibitorbehandlung adulter Schistosomen *in vitro* wurden die folgenden Inhibitoren verwendet:

	<b>Herbimycin A</b>	<b>TGF-β RI Kinase Inhibitor (TRIKI)</b>
Firma	Enzo Life Sciences	Calbiochem
Summenformel	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>
CAS-Nummer	70563-58-5	396129-53-6
Lösbarkeit	1 mg/ml in DMSO	5 mg/ml in DMSO
Eingesetzte, finale Konzentrationen	4,5 µM	150 nM; 300 nM; 1 µM

### 2.1.3 Enzyme

Während dieser Arbeit wurden die folgenden Enzyme für molekularbiologische Arbeiten verwendet:

Enzym	Firma
DNase (RNase frei)	DNaseI (Fermentas) DNaseI (Qiagen)
Proteinase K	Merck
Restriktionsendonukleasen vom Typ II	New England Biolabs
Reverse Transkriptase	Qiagen (Quantiscript, Sensiscript) Invitrogen (Super Script II) Thermoscript (Invitrogen)
RNaseA (DNase frei)	Sigma
RNasin	Promega
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs (Cat.No. M0273L) Solis Biodyne (FIREPol DNA Polymerase I) Quanta (PerfeCTa® SYBR® Green Super Mix) <i>Pfu</i> DNA Polymerase (Promega)
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T7 und SP6 RNA-Polymerase; DNA-abhängige RNA-Polymerase	Roche (T7 RNA-Polymerase, Cat.No. 10881767001; SP6 RNA-Polymerase, Cat.No. 11487671001)

### 2.1.4 Molekulargewichtsstandards

Für eine gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA werden entsprechende Größenstandards verwendet. Dabei werden bei der DNA-Auftrennung die HyperLadder I und II der Firma Bionline und die Ribo Ruler RNA Ladder High Range und Low Range von Fermentas für die RNA-Auftrennung genutzt.

### 2.1.5 Bakterien- und Hefestämme

Für die Arbeit wurde der folgende Bakterienstamm verwendet:

NEB 10-beta: Hitzeschock-kompetente *E. coli* – Zellen (New England Biolabs, 2008)  
[*araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *fhuA*, *lacX74*, *galK* ( $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*) M15), *mrcA*, *galU*,  
*recA1*, *endA1*, *nupG*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>),  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)



Für die Arbeit mit Hefen wurden die folgenden Hefestämme verwendet:

AH109:	MATa, <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::Gal1<sub>UAS</sub><sup>-</sup></i> <i>Gal1<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>MEL1</i> , <i>GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> (James et al., 1996)
Y187:	MATa, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4Δ</i> , <i>met<sup>-</sup></i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::Gal1<sub>UAS</sub><sup>-</sup> Gal1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> (Clontech, 2002)

### 2.1.6 Antikörper

Der anti-Digoxigenin Antikörper (Fab-Fragment; Roche; Alkalische Phosphatase-gekoppelt) wird in einer 1:500 Verdünnung für den Detektionsschritt der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Mit Hilfe des monoklonalen anti-BrdU Antikörpers (Sigma) erfolgt die Bestimmung der mitotischen Aktivität durch Detektion des eingebauten BrdUs (5-Brom-2'-deoxyuridin).

### 2.1.7 Primer

Für die in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide werden die T<sub>m</sub>-Werte anhand der Formel T<sub>m</sub> [°C] = 2 × (A + T) + 4 × (G + C) (Rychlik & Rhoads, 1989) angegeben. Angefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder Tags sind weinrot, zusätzlich eingefügte Nukleotide zum Erhalt des korrekten *ORFs* (*Open Reading Frame*) sind blau in der Sequenz markiert.

Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
5'-LGLH	AGCCAAGCTTACAGGAATTCC	63
3'-LGLH	GAATAACAGCGTTCCTTGAATAC	60
LGLH_ish 5'	TGCTTATGGTGATGGTGCAT	64
LGLH_ish 3'	GCCAATCGGGTTGAGTTAAA	64
LGLH-fl 5'	ATGGCACAGAGGATCTTGG	63
LGLH-fl 3'	CTATGGACCAGAAGACATGTG	60
LGLH-fl-2-5'	ATGTGTCTTGGTCATGGTG	60
LGLH-RNAi-3'	GCAAATCCGTGTGAAGAAC	61
LGLH-RNAi-T7-3'	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAAATCCGTGTGAAGAAC	61
LGLH-RNAi-T7-5'	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCTTATGGTGATGGTGCAT	64
LGLH_N-Term 5'-SmaI	CCCGGGATGGCACAGAGGATCTTGAACC	70
LGLH_N-Term 3'-EcoNI	CCTTCGGTAGGCTGACCATTTTGC	72
LGLH_C-Term 5'-EcoNI	CCTACCGAAGGTGTCCCTC	64
LGLH_C-Term 3'-SalI	GTCGACCGCTATGGACCAGAAGACATGTG	63
LGLH_intern_SalI3'	GTCGACCGCTTCGGTAGGCTGACCATTTTGC	72
LGLH_intern_SmaI5'	CCCGGGCGCTACCGAAGGTGTCCCTC	64
LGLH_N-Term5'-SmaI_neu	CCCGGGATGGCACAGAGGATCTTGAACC	74
Scribble_N-Term5'-XmaI	CCCGGGGATGTTTCATCTGAATGTTGATC	58

## Material und Methoden

Scribble_N-Term3'-XhoI	CTCGAGCGGTGAAACGGATGCTCG	68
Scribble_C-Term5'-XmaI	CCCGGGGAATCCTGATTCAAATTCATTG	59
Scribble_C-Term3'-SacI	GAGCTCGTAATGACGTACAGCAGCCTC	62
Scribble_ish-5'	GGGAGTTCTTTGGTGACTAACG	64
Scribble_ish-3'	CTGCTTCTTCACTATCCATTCC	62
Scribble-fl-pBridge-5'	CCCGGGGATGTTTCATCTGAATGTTGATC	58
Scribble-fl-pBridge-3'	CTGCAGGCTAATGACGTACAGCAGCC	58
Scribble-dsRNA-5'	ACCGTCGACTTCACCATC	56
Scribble-dsRNA-T7-5'	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACCGTCGACTTCACCATC	56
Scribble-dsRNA-3'	CCACTGCTATAGGCGTCCT	60
Scribble-dsRNA-T7-3'	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACCGTCGCTATAGGCGTCCT	60
Scribble-N-Term-pBridge-3'	CTGCAGGCGGTGAAACGGATGC	52
Scribble-C-Term-pBridge-5'	CCCGGGGAATCCTGATTCAAATTCATTG	60
Scribble-dsRNA-5'-neu	CGACTTCACCATCATCAAC	56
Scribble-dsRNA-3'-neu	CACCTCCACTGCTATAGGC	60
Scribble-dsRNA-T7-5'-neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGACTTCACCATCATCAAC	56
Scribble-dsRNA-T7-3'-neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGACACCTCCACTGCTATAGGC	60
Discs-dsRNA-5'	TGAACAATATTCAGTGATGTCTTG	58
Discs-dsRNA-T7-5'	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGAACAATATTCAGTGATGTCTTG	68
Discs-dsRNA-3'	GTCCTCTAGTGAGAAATACTTCC	59
Discs-dsRNA-T7-3'	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCCTCTAGTGAGAAATACTTCC	62
TGFbRI_intra_BamHI-5'	GGATCCTACTTCTCTGGAGAAGG	54
TGFbRI_intra_EcoRV-3'	GATATCTAAATGCTTTGAATTACTATTG	53
TGFbRI_intra_BamHI-5'_neu	GGATCCTACTTCTCTGGAGAAGGAAATC	66
TGFbRI_intra_EcoRV-3'_neu	GATATCTAAATGCTTTGAATTACTATTGTTATTGG	72
Jux_447_BamHI5' (SER3)	GGATCCTAAAAAGATCTAAATATATACGAATTG	64
Jux_447_EcoRI3' (SER3)	GAATTCATAATTCAGATTCACTGATTATACG	64
TK_447_BamHI5' (SER3)	GGATCCTAATTCGTGGTCCATTGATTGG	62
TK_447_SacI3' (SER3)	GAGCTCATAAAGCTGAACATAATTCTTTAAATGTTGG	78
TK_297_BamHI5' (SER2)	GGATCCTATGCTTAAATGAAAAATCGGG	58
TK_297_EcoRI3' (SER2)	GAATTCAAAACATGTTATACAGTTCCAC	54
TK_SER_BamHI5'	GGATCCTTGATTTCAACTCAGCTCCTCTAGG	72
TK_SER_EcoRI3'	GAATTCATGTACGCATAAGTTCAATAAATGTAGG	74
EGFR_297_C-Term_3' (SER2)	GAATTCGCTACGTTTTGTGTAGAATATGTTGG	72
Jux_297_2_5' (SER2)	GGATCCGAAAGCCCCAAATCTAGGCAGATTAG	80
EGFR_447_C-Term_3' (SER3)	GAGCTCGTTACTTTATTACAATTATTTTC	54
EGFR_SER_C-Term_3'	GAGCTCGCTATAATTCCAGCGAGGATGAC	68
EGFR_SER_C-Term_5'	GAATTCGATTGAAACGAAAAGCTGAAGCAG	68
EGFR_SER_C-Term_XmaI-5'	CCCGGGTTGAAACGAAAAGCTGAAGCAGAAAAAATACG	86
EGFR_447_Jux-TK3' (SER3)	ATGGGATCAAGTTTTTGTCG	56
EGFR_447_Jux-TK5' (SER3)	AATATGGATGAAGAAAAATCTCC	60
Eps-N-SH3-PstI-3'	CTGCAGGAGTTTTCTTTAATCCAGCTGTAGT	68
Abi-BamHI-5'	GGATCCGAATGAGGATGATTGAGAGTAGG	66

Abi-BamHI-3'	GAATTCGTCATTCCGTATCGAAAGGTT	60
80-Eps8	ATGAGGAACAGGGATTTTAATAAAG	66
83-Eps8	TTAGTCTCCATTTGAGTTGAGTCC	68
SER-Jux-5'	CGGGATCCATGGCATGTGTTTAACAGCTGAAC	68
SER-Jux-3'	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTCATGGAGACGATGGGTTTGC GGTTAC	82

Für die quantitative PCR wurden die folgenden Primer verwendet. Es werden der Name des Moleküls, Name des Primers, dessen Nukleotidsequenz in 5'-3'-Richtung und die berechnete Annealingtemperatur (entsprechend den Angaben von Sigma Aldrich, T<sub>m</sub> in °C) in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Molekülname	Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> [°C]
Calmodulin-4	Smp_032990-2-F	ATG AAT GTT CCA ATA ACT CGT G	60
	Smp_032990-2-R	CTC TTC ACT TCT TGA CGA TTG	60
Cathepsin B	Smp_085180_F2	AAC CGT TAT TTG AAA ATT GAT CA	60
	Smp_085180_R2	TGA ATT CGT TTC CCA CCT	60
Cathepsin S	Smp_139240_F	CCA GAA TAC GTT GAT TGG AGA	60
	Smp_139240_R	TGG AGT AAG AGT TCC TGT CTT GA	60
<i>Discs large</i>	Discs-qPCR3-F	TCA CAA GCC ATC ACA CG	60
	Discs-qPCR3-R	GCA CCA AGA AAA AGC TGG	60
<i>Eggshell precursor</i>	Smp_000430_F	CCG TAA AGG TGG TGG C	60
	Smp_000430_R	TTG AAT GTT GAA TAG CCT TGC	60
fs800	Smp_000270_F	CAG CCG AAA AAG TCA AAC A	60
	Smp_000270_R	CCC TTT TGC ATC GTA AGC T	60
Hsp70	Smp_182190.2-F	GCG TGC ACT GAC TAA GGA C	60
	Smp_182190.2-R	CTG CTT CCC AGT ACC CTT G	60
<i>Lethal giant larvae homologue</i>	LGLH-3-5'	GCA CAG AGG ATC TTG GAA CC	64
	LGLH-3-3'	GAC TCC GGA CAT CCA TAA GC	63
Natrium/Kalium-Pumpe	Smp_015020-F	GGC TGA AAA TGG TTT TTG G	60
	Smp_015020-R	AGG CAG TTT GAC ATG TGG	60
p14	p14-F	CCT ATG GCG GTG ATT ATG G	60
	p14-R	GGC TGG GTT TGT AAG TGC	60
p48	p48-F	GAC AAG CAT GGT CAT GGA	60
	p48-R	ATG CTT ATC GTG GTC TTT ACG	60
Scribble	Scribble-qPCR-F	GAT TAG CTG CCA CTT CAG G	60
	Scribble-qPCR-R	GAA TAT CAC GAC CGA CCA	60
SmActRIIb	ActRIIb-F	GGC AGA AAA TTC ACC CA	60
	ActRIIb-R	GGG GCC TGA TAT CGT AAA G	60
SmSmad4	Smp_033950-F	CCT TCT GGG TCC ATA CTC C	60
	Smp_033950-R	CCG TGT AAC CGT CAA CAG TG	60
SmTK3	TK3-F	CGG AAC CAA CGT AAC AGC	60
	TK3-R	GCA AAT GGC CAA AGA AAA	60
SmTβRI	TGFβRI-F	ATG ATC TCA CGT GTG CGA	60
	TGFβRI-R	GAT CCG AAG GGC TGT CTT	60

## Material und Methoden

Snurp	Smp_069880-F	CGG TGG AGA TAT CAA TGC	60
	Smp_069880-R	GCA GCA CGT CTA GCC TC	60
Tetraspanin 1	Smp_155310.1-F	TGT GGA TTA TTG AAT GGA TCT G	60
	Smp_155310.1-R	GGA CAT GTT GGA TCG AGA A	60
Tetraspanin 18	Smp_174190-F	CAA ATC GTA CCG CTT GTC	60
	Smp_174190-R	GCC ATC ATT AAT ACG GCC	60
Tetraspanin-1	Smp_011560-F	CAA AGA ATG CTG GGA ACG	60
	Smp_011560-R	ACC GCG AAT GTA AAC GTA A	60
Tyrosinase 1	Smp_052070-F	CAG GGA CAG CAA GCA ATG	60
	Smp_052070-R	CTT GAA TGT CCA GGA CGA A	60

Für die *in vitro*-Mutagenesen von bereits vorhandenen klonierten DNA-Fragmenten wurden die folgenden Primer verwendet. Die aufgeführte T<sub>m</sub>-Werte werden mit der folgenden Formel berechnet. Dabei entspricht N der Primerlänge in Basen.

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Fehlerrate$$

Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
LGLH_N-Term-Mut-3'	CCG GAA TTC CCG GGG ATG GCA CAG AGG ATC TTG	86
LGLH_N-Term-Mut-5'	CCA AGA TCC TCT GTG CCA TCC CCG GGA ATT CCG G	86
TGFbRI_Mut_1-5'	GAT GGA CCA CGT TGT CGC TGG GGC AGG TGC CGG AAA ACC TT	81,6
TGFbRI_Mut_1-3'	AAG GTT TTC CGG CAC CTG CCC CAG CGA CAA CGT GGT CCA TC	81,6
TGFbRI_Mut_2-5'	CCT TTA CTA GTT CAG CGA GTG GTC GCT AGG GTA GTT CAG TTG G	82,7
TGFbRI_Mut_2-3'	CCA ACT GAA CTA CCC TAG CGA CCA CTC GCT GAA CTA GTA AAG G	82,7
TGFbRI_Mut_3-(7D)-5'	GAT GGA CCA CGA TGA CGA TGG GGA CGG TGA CGG AAA ACC TTT ACT	78,2
TGFbRI_Mut_3-(7D)-3'	AGT AAA GGT TTT CCG TCA CCG TCC CCA TCG TCA TCG TGG TCC ATC	78,2
TGFbRI_Mut_4-(7D)-5'	CCT TTA CTA GTT CAG CGA GAT GTC GCT AGG GAC GTT CAG TTG G	81,7
TGFbRI_Mut_4-(7D)-3'	CCA ACT GAA CGT CCC TAG CGA CAT CTC GCT GAA CTA GTA AAG G	81,7

### 2.1.8 Plasmide

Als Grundlage für Klonierungsarbeiten wurden die folgenden kommerziell erhältlichen Plasmide verwendet:

Verwendungszweck	Name des Plasmids
Gal4-AD Vektor für <i>Yeast Two-Hybrid</i> Experimente	pACT2 (Clontech)
Gal4-AD Vektor für <i>Yeast Two-Hybrid</i> Experimente	pGADT-7 (Clontech)
Gal4-BD Vektor für <i>Yeast Two-Hybrid</i> Experimente	pBridge (Clontech)
Klonierungen für die Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	pcDNA 3.1/V5-His B (Invitrogen)
Klonierungsvektor für PCR-Produkte	pDrive (Qiagen)

Folgende rekombinante Plasmide wurden hergestellt und im Weiteren verwendet. Die Plasmide liegen als Glycerinstocks und teils in einer Klonbank (gekennzeichnet anhand entsprechender [Klonnummer]) der AG Grevelding, Institut für Parasitologie, Justus Liebig Universität Gießen, vor. Daneben sind entsprechende Schnittstellen für Restriktionsenzyme angegeben. Sequenzierte Plasmide sind mit \* markiert.

Plasmid-Name	Beschreibung	Hersteller
Abl-interactor-2 (SmAbi-2)	Insert: Volllängenklon SmAbi-2 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Abl-interactor-2 (SmAbi-2) [1391]	Insert: Volllängenklon SmAbi-2 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
Discs RNAi-Template	Insert: RNAi-Template von SmLGL Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Eps-N-Term bis SH3	Insert: N-terminaler Bereich von SmEps8 bis einschließlich der SH3-Domäne ( <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Eps-N-Term bis SH3 [1390]	Insert: N-terminaler Bereich von SmEps8 bis einschließlich der SH3-Domäne ( <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I) Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
Eps8-kurz	Insert N-terminal verkürzte Variante von SmEps8 Vektor: pGADT7-Rec	Von C. Burmeister übernommen *
Eps8-lang	Insert Volllängenklon von SmEps8 Vektor: pGADT7-Rec	Von C. Burmeister übernommen *
LGL	Insert: LGL- <i>in situ</i> -Template Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
LGL-C-Terminus	Insert: C-terminaler Bereich von SmLGL ( <i>Sma</i> I/ <i>Sal</i> I) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
LGL-C-Terminus [1394]	Insert: C-terminaler Bereich von SmLGL ( <i>Sma</i> I/ <i>Sal</i> I) Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
LGL-N-Terminus	Insert: N-terminaler Bereich von SmLGL ( <i>Sma</i> I/ <i>Sal</i> I) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
LGL-N-Terminus [1393]	Insert: N-terminaler Bereich von SmLGL ( <i>Sma</i> I/ <i>Sal</i> I) Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
LGLH RNAi-Template	Insert: RNAi-Template SmLGL Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*

## Material und Methoden

Scribble	Insert: <i>in situ</i> -Template für SmScrib Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Scribble-C-Terminus	Insert: C-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>SmaI/PstI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Scribble-C-Terminus	Insert: C-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>XmaI/SacI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Scribble-C-Terminus [1396]	Insert: C-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>XmaI/SacI</i> ) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
Scribble-C-Terminus [1398]	Insert: C-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>SmaI/PstI</i> ) Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
Scribble-N-Terminus	Insert: N-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>SmaI/PstI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Scribble-N-Terminus	Insert: N-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>XmaI/XhoI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
Scribble-N-Terminus [1395]	Insert: N-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>XmaI/XhoI</i> ) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
Scribble-N-Terminus [1397]	Insert: N-terminaler Bereich von SmScrib ( <i>SmaI/PstI</i> ) Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
SER intrazell. Bereich	Insert: intrazellulärer Bereich von SER ( <i>SacI/EcoRI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
SER intrazell. Bereich [1389]	Insert: intrazellulärer Bereich von SER ( <i>SacI/EcoRI</i> ) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
SER TK-Domäne	Insert: TK-Domäne von SER ( <i>BamHI/EcoRI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt *
SER TK-Domäne [1383]	Insert: TK-Domäne von SER ( <i>BamHI/EcoRI</i> ) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
SER2 intrazell. Bereich	Insert: intrazellulärer Bereich von SER2 ( <i>BamHI/EcoRI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
SER2 intrazell. Bereich [1388]	Insert: intrazellulärer Bereich von SER2 ( <i>BamHI/EcoRI</i> ) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
SER3 Juxtamembran- Bereich	Insert: Juxtamembran-Bereich von SER3 ( <i>BamHI/EcoRI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
SER3 Juxtamembran- Bereich [1386]	Insert: Juxtamembran-Bereich von SER3 ( <i>BamHI/EcoRI</i> ) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
SER3 TK-Domäne	Insert: TK-Domäne von SER3 ( <i>BamHI/SacI</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
SER3 TK-Domäne [1387]	Insert: TK-Domäne von SER3 ( <i>BamHI/SacI</i> ) Vektor: pACT2	Selbst hergestellt*
SmDLG	Insert: N-terminal verkürzter SmDLG-Klon, identifiziert im Y2H-Screening von SmTK4 Vektor: pGADT7-Rec	Übernommen von S. Beckmann *
TGFβRI intrazell. Bereich	Insert: intrazellulärer Bereich des SmTβRI ( <i>BamHI/EcoRV</i> ) Vektor: pDrive	Selbst hergestellt*
TGFβRI intrazell. Bereich [1400]	Insert: "Wildtyp" des intrazellulärer Bereich SmTβRI ( <i>BamHI/EcoRV</i> ) Vektor: pcDNA5-B	Selbst hergestellt*
TGFβRI intrazell. Bereich, Mutagenese 1	Insert: intrazellulärer Bereich des SmTβRI ( <i>BamHI/EcoRV</i> ) Vektor: pcDNA5-B	Selbst hergestellt*
TGFβRI intrazell. Bereich, Mutagenese 2 [1401]	Insert: inaktiver intrazellulärer Bereich des SmTβRI ( <i>BamHI/EcoRV</i> ) Vektor: pcDNA5-B	Selbst hergestellt*
TGFβRI intrazell. Bereich, Mutagenese 3	Insert: intrazellulärer Bereich des SmTβRI ( <i>BamHI/EcoRV</i> ) Vektor: pcDNA5-B	Selbst hergestellt*
TGFβRI intrazell. Bereich, Mutagenese 4 [1402]	Insert: aktiver intrazellulärer Bereich des SmTβRI ( <i>BamHI/EcoRV</i> ) Vektor: pcDNA5-B	Selbst hergestellt*

TK3SH2	Insert: SH2-Domäne von SmTK3 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I) Vektor: pBridge	Von C. Phillip übernommen *
TK3SH3	Insert: SH3-Domäne von SmTK3 ( <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI) Vektor: pBridge	Von S. Beckmann übernommen *
TK3SH3 + TK5TK	Insert: MCS1 SH3-Domäne von SmTK3, MCS2 TK-Domäne von SmTK5, MCS1 <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI, MCS2 <i>Bgl</i> II/ <i>Not</i> I Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
TK3SH3SH2 + TK3TK	Insert: MCS1 SH3- und SH2-Domänen von SmTK3, MCS2 TK- Domäne von SmTK5, MCS1 <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI, MCS2 <i>Bgl</i> II/ <i>Not</i> I Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
TKSH2 + TK5TK	Insert: MCS1 SH2-Domäne von SmTK3, MCS2 TK-Domäne von SmTK5, MCS1 <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI, MCS2 <i>Bgl</i> II/ <i>Not</i> I Vektor: pBridge	Selbst hergestellt*
TKSH3SH2	Insert: SH3- und SH2-Domänen von SmTK3 ( <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI) Vektor: pBridge	Von S. Beckmann übernommen *

### 2.1.9 Verwendete siRNAs

Für diese Arbeit wurden die folgenden kommerziell hergestellten siRNAs (Riboxx) eingesetzt:

Name der siRNA	mRNA Sequenz (5' → 3'), Position in der Sequenz (bp)	Riboxx siRNA antisense (5' → 3')
TK3-1	GCA CCA GAT TCT TCA CAA A, 218-236	UUU GUG AAG AAU CUG GUG CCC CC
TK3-2	GAG AAT CAA TCT GGT TTA T, 953-971	AUA AAC CAG AUU GAU UCU CCC CC
TK3-3	GCT CGT ATG ATT CAT AAC A, 1496-1514	UGU UAU GAA UCA UAC GAG CCC CC
TK3-4	GGT CAA GCA TCC AAT TCT A, 182-200	UAG AAU UGG AUG CUU GAC CCC C
TGFβRI-1	GGT CAA AGC ATG AAA TTA T, 1700-1718	AUA AUU UCA UGC UUU GAC CCC C
TGFβRI-2	GCC ACG TAA TAC TAT GAA T, 1923-1941	AUU CAU AGU AUU ACG UGG CCC CC
TGFβRI-3	GGA TCT TTC ACA TAC TAA T, 1845-1863	AUU AGU AUG UGA AAG AUC CCC C
TGFβRI-4	CCT GTC GTC TAA ATC TTAT, 221-239	AUA AGA UUU AGA CGA CAG GCC CCC

### 2.1.10 Genbanken

Als Grundlage für *Yeast Two-Hybrid* Experimente dient eine GAL4-basierte cDNA-Bank in dem Vektor pGADT7-Rec (Clontech, 2002; Matchmaker, 2001; Quack et al., 2009). Die cDNA wurde anhand von isolierter RNA aus adulten Schistosomen (Männchen und Weibchen) amplifiziert.

### 2.1.11 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin) automatisiert durchgeführt. Dabei beruht das Prinzip der Sequenzierungen auf dem Sanger-Verfahren.

### 2.1.12 Internetprogramme

Diese aufgeführten Internetprogramme wurden für Sequenz-, Struktur-, Microarray- und Bioinformatikanalysen verwendet:

<u>Pubmed:</u>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi</a>
<u>NCBI:</u>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
<u>NCBI-BLAST:</u>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
<u>NCBI-Conserved Domain Search:</u>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd</a>
<u>S. mansoni-Blast (Omni-Blast):</u>	<a href="http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni/omni">http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni/omni</a>
<u>Multialignment:</u>	<a href="http://prodes.toulouse.intra.fr/multalin/multalin.html">http://prodes.toulouse.intra.fr/multalin/multalin.html</a>
<u>ClustalW2:</u>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
<u>SMART:</u>	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
<u>Molecular Toolkit:</u>	<a href="http://www.vivo.colostate.edu/molkit">http://www.vivo.colostate.edu/molkit</a>
<u>Ontologizer:</u>	<a href="http://compbio.charite.de/contao/index.php/ontologizer2.html">http://compbio.charite.de/contao/index.php/ontologizer2.html</a>
<u>Ingenuity Pathway Analysis:</u>	<a href="http://www.ingenuity.com/">http://www.ingenuity.com/</a>
<u>Feature Extraction Software:</u>	Agilent Technologies
<u>Spotfire:</u>	<a href="http://spotfire.tibco.com/">http://spotfire.tibco.com/</a>
<u>R:</u>	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
<u>Image J:</u>	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
<u>cellSens Dimension Software:</u>	Olympus



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni* unter Laborbedingungen**

*Schistosoma mansoni* besitzt einen komplexen Lebenszyklus, wobei unter Laborbedingungen Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria glabrata* als Zwischenwirte und als Endwirte syrische Goldhamster der Gattung *Mesocricetus auratus* verwendet werden. Die verwendeten Schistosomen gehören zu dem ursprünglich in Liberia isolierten Stamm (Gönnert, 1955; Grevelding, 1995).

#### **2.2.1.1 Isolierung der Eier und Zwischenwirtsinfektion**

Die Infektion des Zwischenwirts erfolgt mit Miracidien, die aus den Lebern infizierter Endwirte isoliert werden. Dafür werden die Lebern zerkleinert, mit 1x PBS gewaschen und anschließend homogenisiert. Nach einer Zentrifugation wird das erhaltene Pellet mehrmals mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Für die Gewinnung der Miracidien aus den Eiern wird das Licht-induzierte Schlüpfen der Miracidien genutzt. Dafür wird das pelletierte Leberhomogenat in einen Kolben überführt, der mit warmem Leitungswasser gefüllt ist, und dieser wird mit Ausnahme eines Steigrohres abgedunkelt. Das Steigrohr wird mit Licht zum Auslösen des Schlüpfprozesses bestrahlt, wodurch sich die Miracidien phototaktisch zur Lichtquelle bewegen. Die Miracidien werden im Steigrohr abgesammelt, titriert und anschließend für die Infektion der Schnecken verwendet.

Die Schneckeninfektionen werden unterschieden in mono- und polymiracidial. Bei einer monomiracidialen Infektion werden Schnecken jeweils nur mit einem Miracidium infiziert. Bei dieser Art der Infektion entwickeln sich Cercarien eines Geschlechtes, da innerhalb der Schnecken lediglich ungeschlechtliche Vermehrungen im Sporocystenstadium stattfinden (Den Hollander & Erasmus, 1984). Im Vergleich dazu werden bei einer polymiracidialen Infektion die Schnecken mit je 10-15 Miracidien infiziert, wodurch sich Cercarien beider Geschlechter entwickeln. Für die Infektion der Schnecken UN werden diese zunächst vereinzelt in 12-Well-Platten gesetzt und anschließend mit der entsprechenden Anzahl an Miracidien inkubiert. Am folgenden Tag werden diese Schnecken in ein Aquarium umgesetzt und ab dem 21. Tag nach der Infektion abgedunkelt und für weitere zwei Wochen in diesem Zustand gehalten.

#### **2.2.1.2 Endwirtinfektion**

Als Endwirte werden 6-8 Wochen alte Hamster genutzt, die mit Cercarien infiziert werden. Nach Ablauf der 5-wöchigen Infektionsdauer in den Schnecken wird das Schlüpfen der Cercarien aus den Schnecken durch einen phototaktischen Reiz ausgelöst. Dafür werden

die infizierten Schnecken einzeln in 12-Well-Platten gesetzt und für 2h belichtet. Die freischwimmenden Cercarien werden gesammelt und deren Titer sowie Geschlecht bestimmt. Das Geschlecht der Cercarien wird anhand einer geschlechtsspezifischen PCR ermittelt, wobei man die Abundanz der sogenannten W1-Elemente nutzt (Grevelding, 1995). Es handelt sich dabei um repetitive Elemente, von denen viele Kopien in Weibchen, aber nur wenige in Männchen gefunden werden. Aufgrund dieser quantitativen Unterschiede kann mittels PCR die Geschlechtsbestimmung erfolgen.

Acht Wochen alte Hamster werden mit 2.000 Cercarien infiziert. Dazu werden die Hamster zum Aufweichen der Haut zunächst für 45-60 min in 37°C warmem Schneckenwasser gebadet und anschließend die Cercarien dem Wasser zugesetzt (Dettman et al, 1989).

### **2.2.1.3 Perfusion des Endwirts**

Die Gewinnung adulter Schistosomen und deren Eier erfolgt 7 Wochen post Infektion. Dabei werden die Hamster zunächst mit Isofluran narkotisiert. Im Anschluss erfolgt eine intraperitoneale Injektion einer Überdosis Xylarium und Ketamin. Die Hamster werden auf verbliebene Reflexe untersucht, mit Alkohol desinfiziert und der Brustkorb geöffnet. Es folgt die eigentliche Perfusion (Duvall & DeWitt, 1967). Dabei wird zunächst die Pfortader der Hamster angestochen, um eine Austrittsstelle für die Schistosomen zu schaffen. Danach wird der Kreislauf der Tiere mittels Perfusionsmedium durchgespült, dabei erfolgt der Zugang über eine Kanüle in den linken Herzventrikel. So ist das Herausspülen der Schistosomen aus den Mesenterialvenen möglich. Die erhaltenen Würmer können für weiterführende Versuche genutzt werden.

### **2.2.2 In vitro Kultivierung adulter Schistosomen**

Durch die Perfusion gewonnene adulte Schistosomen können *in vitro* kultiviert werden. Dafür wird als Medium M199 (Gibco; + 1% ABAM, 1% HEPES, 10% NCS) genutzt. Die erhaltenen Würmer werden in Petrischalen überführt und zweimal mit Medium gewaschen. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Das Medium wird abhängig von dessen Zustand (sichtbar durch eine pH-Änderung) oder den Versuchen jeden Tag oder nach längerem Zeitraum gewechselt.

#### **2.2.2.1 In vitro Behandlung adulter Schistosomen mit Inhibitoren oder BrdU**

Die Inhibitorbehandlung erfolgte durch tägliche Zugabe von entweder 4,5 µM Herbimycin A (C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>; Enzo Life Science; CAS-Nummer: 70563-58-5), 150 nM, 300 nM,

500 nM oder 1  $\mu$ M TRIKI (HTS-466284, LY-364947;  $C_{17}H_{12}N_4$ ; Calbiochem; CAS 396129-53-6) sowie der Kombination beider Inhibitoren zu frisch gewechseltem Medium. Zur Bestimmung mitotischer Aktivität Inhibitorbehandelter Würmern wurde dem Medium zusätzlich 1 mM 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU, Serva) zugesetzt.

### **2.2.3 Arbeit mit Bakterien**

#### **2.2.3.1 Herstellen von Bakterien-Glycerinstocks**

Eine langfristige Aufbewahrung von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden erfolgt mit Hilfe von Glycerinstocks. Dafür werden die entsprechenden Bakterien üN bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wird 1 ml der Kultur entnommen und mit 500  $\mu$ l Glycerin gemischt. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

#### **2.2.3.2 Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur**

Ausgehend von einem Glycerinstock bzw. einer Bakterienkolonie können Bakterien als Flüssigkultur angezogen werden. Als Vollmedium wird dafür standardmäßig LB-Medium verwendet. Bei Verwendung von Bakterien, die rekombinante Plasmid-DNA tragen, wird das Medium ergänzend mit Antibiotika versetzt, da diese Bakterien aufgrund vorhandener Resistenzmarker der Plasmid-DNA eine Resistenz gegenüber den Antibiotika entwickeln. So wird beispielsweise bei Ampicillin-Resistenz-vermittelnden Plasmiden dem LB-Medium Ampicillin in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgt üN bei 37°C und 200 rpm.

#### **2.2.3.3 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterienzellen**

Von einem 1  $\mu$ l Aliquot der „NEB 10-beta Competent *E.coli*“ (New England Biolabs) Zellen wird eine 10 ml Kultur (LB-Medium) angeimpft und diese üN bei 37°C und 200 rpm inkubiert (Sambrook et al., 1989). Von dieser üN-Kultur wird am folgenden Tag 1 ml in 100 ml warmes LB-Medium überführt und die Bakterien bei 37°C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 weiter inkubiert. Beim Erreichen dieser optischen Dichte werden die Bakterien für 5 min auf Eis gekühlt, durch zentrifugieren gesammelt und das erhaltene Zellpellet in 30 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird für 90 min auf Eis gehalten, erneut zentrifugiert und das Bakterienpellet in 4 ml TFB2-Puffer überführt. Von dieser Suspension werden 100  $\mu$ l Aliquots hergestellt und unmittelbar in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Hitzeschock-kompetenten Zellen werden bei -80°C gelagert. Um die Kompetenz dieser Bakterien zu testen, erfolgt eine Transformation mit 100 pg „pUC19 Control DNA“ (New England Biolabs, 2008). Die Vorgehensweise erfolgt wie vom Hersteller

empfohlen. Die erhaltenen Kolonien werden gezählt und die Transformationseffizienz bestimmt. Diese sollte dabei für kompetente Zellen bei  $1\text{-}3 \times 10^9$  cfu/ $\mu\text{g}$  pUC19 DNA liegen.

### **2.2.3.4 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen**

Bei einer Transformation handelt es sich um die Integration extrachromosomaler Plasmid-DNA in ein Bakterium. Bei der standardmäßig verwendete Transformation integriert das Bakterium die Plasmid-DNA mit Hilfe eines Hitzeschocks (Sambrook et al., 1989). Dabei werden die Hitzeschock-kompetenten „NEB 10-beta Competent *E. coli*“ Zellen (New England Biolabs, 2008) zunächst auf Eis aufgetaut und die Plasmid-DNA (mindestens 1 ng) hinzugegeben. Die Inkubation des Gemisches erfolgt für 20 min auf Eis. Im Anschluss erfolgt der Hitzeschock, dabei wird die Probe für 1 min auf  $42^\circ\text{C}$  erhitzt und anschließend für 3 min auf Eis abgekühlt. Durch diesen Hitzeschock wird die Membran der Bakterien permeabilisiert und die Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglicht. Es folgt eine mindestens 45-minütige Inkubationsphase bei  $37^\circ\text{C}$  und 200 rpm unter Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  LB-Medium. Entsprechend der Resistenzmarker der Plasmid-DNA werden die Bakterien einer Wachstumsselektion unterzogen. Die Kultivierung der transformierten Bakterien erfolgt üN bei  $37^\circ\text{C}$ .

#### **2.2.3.4.1 Blau-Weiß-Selektion von Bakterien nach vorangegangener Transformation**

Neben der Wachstumsselektion mit Ampicillin können die Bakterien einer Farbselektion unterzogen werden (Sambrook et al., 1989). Dafür werden LB-Platten verwendet, die Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IPTG (2 mM) und X-Gal (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthalten. Mit Hilfe dieser zusätzlichen Komponenten erfolgt die Selektion auf Bakterien, die eine Plasmid-DNA mit integriertem *LacZ*-Gen beinhalten. Dieses Gen kodiert die  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) und ist z.B. im Vektor pDrive (Qiagen) enthalten. Ist ein Induktor wie beispielsweise IPTG (Isopropylthiogalactosid) vorhanden, wird die  $\beta$ -Gal exprimiert. Als Substrat der  $\beta$ -Gal wird X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoyl-b-D-galactosid) eingesetzt, welches durch das Enzym gespalten wird. Unter Sauerstoffzufuhr entsteht bei dieser Spaltung der Farbstoff Indigo. Bei erfolgreicher Ligation von PCR-Produkten in pDrive wird der *ORF* für die  $\beta$ -Gal unterbrochen, sodass das Enzym nicht exprimiert werden kann. Bei Religation des Vektors hingegen, d.h. keine Ligation des Inserts, findet die Expression der  $\beta$ -Gal statt, und es kommt zur Blaufärbung der Kolonien. Im Gegensatz dazu zeigen die Kolonien mit dem integrierten Insert im Vektor eine Weißfärbung. Somit ist eine Farbselektion der Bakterien möglich.

## **2.2.4 Arbeit mit Hefen**

### **2.2.4.1 Herstellen von Hefe-Glycerinstocks**

Wie in Abschnitt 2.2.3.1 für Bakterien beschrieben, ist eine langfristige Aufbewahrung von Hefeklonen ebenfalls als Glycerinstock möglich. Dafür werden 250 µl Glycerin und 750 µl einer üN-Kultur der entsprechenden Hefen gemischt. Die Lagerung des Glycerinstocks erfolgt bei -80°C.

### **2.2.4.2 Anzucht von Hefen als Flüssigkultur**

Ausgehend von einem Glycerinstock oder einer Hefekolonie ist das Anziehen einer Flüssigkultur von Hefeklonen möglich. Entscheidend für die Wahl des Flüssigmediums ist der verwendete Hefeklon, d.h. untransformierte Hefezellen werden in Vollmedium (YPDA) kultiviert, transformierte Hefen in Selektionsmedien (SD; *Synthetic Dropout*). Die Kultivierung erfolgt in 6-10 ml des entsprechenden Mediums bei 30°C und 200 rpm üN.

### **2.2.4.3 Anzucht von Hefen auf Agarplatten**

Das Wachstum von Hefezellen erfolgt entweder auf Vollmedium- (1x YPDA) oder auf Selektionsplatten (SD; *Synthetic Dropout*). Bei Verwendung von Selektionsplatten werden Wachstumsselektionsmarker gezielt genutzt. Dabei fehlt den SD-Platten mindestens eine essentielle Aminosäure, wodurch nur die Hefen wachsen können, die diese Aminosäure eigenständig synthetisieren. Die Selektionsmarker befinden sich meistens in der Plasmid-DNA. Die Kultivierung erfolgt bei 30°C für 4-5 Tage.

### **2.2.4.4 Herstellung kompetenter Hefezellen**

Kompetente Hefezellen werden standardmäßig durch die Lithium-Acetat-Methode hergestellt (Clontech, 2002). Dafür werden 30 ml einer 50 ml üN-Kultur (Inkubation bei 30°C, 200 rpm) in 300 ml YPD-Medium überführt. Die optische Dichte (OD) dieser Suspension sollte 0,2-0,3 betragen. Es folgt eine weitere Inkubation bei 30°C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6. Durch eine Zentrifugation werden die Zellen gesammelt und anschließend mit 1x TE gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das erhaltene Hefepellet mit 1,5 ml 1x TE/1x LiAc resuspendiert, wodurch die Hefezellen für die folgende Transformation kompetent sind.

### 2.2.4.5 Hefetransformation bzw. Co-Transformation

Die (Co-)Transformation erfolgt, wie in dem Yeast Protocols Handbook angegeben mit kompetenten Hefezellen der Lithium-Acetat-Methode (Clontech, 2002). Dabei werden zu 0,1 µg Plasmid-DNA und 0,1 mg Heringssperma-DNA 0,1 ml der kompetenten Hefezellen gegeben, das Gemisch gevortext und zur Verbesserung der Plasmid-Aufnahme jeweils 600 µl 40% iger PEG/LiAc-Lösung (8 ml 50% PEG-Lösung verdünnt mit 1 ml 10x TE- und 1ml 10x LiAc-Puffer) zugefügt. Der Ansatz wird gevortext und für 30 min bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl DMSO und vorsichtigem Mischen erfolgt der Hitzeschock. Dafür werden die Zellen für 15 min auf 42°C erhitzt, anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt und durch eine Zentrifugation pelletiert. Das erhaltene Hefepellet wird in 100 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Die Kultivierung erfolgt bei 30°C für 2-4 Tage. Bei einer Co-Transformation werden je 0,1 µg pro Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben, die weitere Vorgehensweise entspricht der beschriebenen.

### 2.2.5 Isolation von Nukleinsäuren

#### 2.2.5.1 DNA-Isolierung aus adulten *Schistosoma mansoni*

Für die DNA-Isolation werden mindestens 20 Würmer verwendet, welche bei -80°C bzw. in Flüssigstickstoff gelagert wurden. Diese Würmer werden zunächst mit 425 µl Extraktionspuffer versetzt und mit Hilfe eines Pistills homogenisiert. Anschließend werden 50 µl 10% SDS sowie Proteinase K (Endkonzentration 500 µg/ml) hinzugegeben und die Proben 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase erfolgt ein RNase A-Verdau (Endkonzentration 200 µg/ml) für 10 min bei 37°C. Zum Aufreinigen der isolierten DNA wird eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung durchgeführt. Dabei wird zunächst ein ½ Volumen Phenol hinzugegeben, das Gemisch zentrifugiert und die erhaltene Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Phase wird mit jeweils einem ½ Volumen Phenol und Chloroform gemischt, zentrifugiert und die Oberphase erneut überführt. Anschließend wird die Oberphase mit 1 Volumen Chloroform gemischt, zentrifugiert und die erhaltene Oberphase für die Fällung der DNA mit einem ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen 99,8% EtOH (eiskalt) gemischt und bei -20°C für mindestens 20 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation schließt sich ein Waschschriff mit eiskaltem 70% EtOH sowie eine weitere Zentrifugation an. Das DNA-haltige Pellet wird kurz angetrocknet und in 30 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wird die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

#### **2.2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Standardmäßig wird Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien mit Hilfe des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ (PeqLab) isoliert. Die Nutzung des Kits erfolgt nach Angaben des Herstellers. Nach der Kultivierung der Bakterien (in 5 ml LB-Medium, 37°C, üN) erfolgt das Sammeln der Zellen durch Zentrifugation und anschließender Lyse der Zellen. Das dabei zugrunde liegende Prinzip des bakteriellen Aufschlusses ist die Alkalische Lyse. Nach dem Aufschluss folgen ein Neutralisierungsschritt und eine Zentrifugation. Die Plasmid-DNA wird mittels Säulenchromatographie an eine Silikamatrix gebunden, gewaschen und abschließend von der Matrix eluiert. Die isolierte Plasmid-DNA wird bei -20°C gelagert.

#### **2.2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen**

Aufgrund der Zellwandstruktur von Hefen ist eine Alkalische Lyse für den Zellaufschluss nicht möglich, weshalb das Nutzerprotokoll des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ (PeqLab) abgewandelt wird (Jones, 2001). Die Kultivierung der Hefen erfolgt in 8 ml Selektionsmedium üN bei 30°C. Um die Zellwände der Hefezellen aufzubrechen, werden diese mittels mechanischen Drucks 5 min unter Verwendung von *Glass beads* (Sigma) gevortext. Der entstandene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann mit dem im Kit enthaltenem Lysispuffer versetzt werden. Die weitere Vorgehensweise erfolgt wie im Nutzerprotokoll angegeben. Die isolierte Plasmid-DNA der Hefezellen wird bei -20°C gelagert.

#### **2.2.5.4 RNA-Isolierung aus adulten und larvalen Schistosomen**

Um Gesamt-RNA aus verschiedenen Lebenszyklus-Stadien von *S. mansoni* zu gewinnen, werden diese mit dem „peq Gold Trifast“ (PeqLab) Reagenz versetzt. Als Ausgangsmaterial dienen mindestens 10 adulte Würmer und 100.000 Larven. Die Proben werden mit 1 ml Reagenz versetzt und anschließend mit Hilfe eines Pistills bzw. *Glass beads* (Sigma) homogenisiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wird bei -80°C gelagert.

#### **2.2.5.5 RNA-Isolierung aus Hefen**

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Hefen werden diese zunächst in 5 ml Flüssigmedium üN bei 30°C kultiviert. Durch einen Zentrifugationsschritt werden die Zellen gesammelt. Das erhaltene Zellpellet wird einmal mit 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Aufschluss der Zellen erfolgt durch 3 „freeze & thaw“-Zyklen, d.h. die Zellen werden zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend bei 37°C aufgetaut.

Im Anschluss wird das Hefepellet mit 1 ml „peq Gold Trifast“ (PeqLab) versetzt und die RNA-Isolation wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt.

### **2.2.5.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Eine analytische Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt durch eine elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren mittels Agarosegelen (Sambrook et al., 1989). Durch Anlegen einer Spannung migrieren negativ geladene Nukleinsäuren (aufgrund ihrer Phosphatreste) in Richtung Anode innerhalb eines elektrischen Feldes. Das Laufverhalten der Nukleinsäuren hängt von ihrer Größe und Konformation ab, d.h. kleinere DNA-Fragmente stoßen auf geringeren Widerstand innerhalb der Gelmatrix als größere, wodurch eine stärkere Auftrennung erfolgt.

Mit Hilfe von Agarosegelen ist eine elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten der Größe 0,1-10 kb möglich. Dabei ist der Anteil an Agarose im Gel entscheidend, d.h. um 0,1 kb optimal im Gel aufzutrennen, sollte eine Agarosekonzentration von 2% (w/v) genutzt werden. Für größere DNA-Fragmente eignet sich eine Agarosekonzentration von 0,5%-1% (w/v). Die entsprechende Menge Agarose wird mit 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (EtBr; Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese wird ebenfalls 1x TAE-Puffer mit gleicher Endkonzentration an EtBr verwendet. Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit einem Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt, welcher 50% Sucrose enthält und dadurch die Dichte der DNA-Lösung erhöht, was ein Absinken der DNA in die Geltaschen bewirkt. Der verwendete Probenpuffer beinhaltet weiterhin 0,6% Orange G, welches eine Orangefärbung der DNA-Lösung zur Folge hat. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung (100-180 Volt) an das Gel erfolgt die Auftrennung der DNA in Richtung Anode. Dieser Prozess lässt sich durch den verwendeten Probenpuffer und dessen Orangefärbung erkennen. Nach erfolgter Auftrennung der DNA-Fragmente werden diese unter UV-Licht sichtbar gemacht. Aufgrund der Interkalierung in DNA-Doppelstränge und der Fluoreszenz durch UV-Lichtanregung, können DNA-Fragmente mittels EtBr detektiert werden.

Für eine elektrophoretische Auftrennung von RNA-Fragmenten werden denaturierende Formaldehydgele verwendet. Die in der RNA ausgebildeten Sekundärstrukturen werden zunächst durch Denaturierung aufgebrochen. Wie bereits für DNA beschrieben, besitzen auch RNA-Fragmente ein größen- und konformationsabhängiges Laufverhalten in einer Gelmatrix. Um eine Denaturierung der Sekundärstrukturen der RNA zu gewährleisten, wird für die Herstellung des Gels Formaldehyd verwendet. Es handelt sich bei diesen Gelen um 1,2% ige Agarosegele, d.h. 1,8 g Agarose wird in 110 ml dH<sub>2</sub>O und 15 ml



10x MOPS-Puffer aufgekocht und anschließend mit 25 ml Formaldehyd versetzt. Als Laufpuffer wird 1x MOPS-Puffer verwendet. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der RNA werden die Proben mit einem RNA-Loading-Puffer gemischt (Formamid-haltig, Endkonzentration 1x), für 5 min aufgekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Bei dem Aufkochen kommt es zur Denaturierung der RNA, allerdings sind trotz diesen Bedingungen noch schwache Sekundärstrukturen vorhanden, wodurch eine Interkalierung von EtBr in diese Bereiche möglich ist. Wie auch DNA-Fragmente migriert die denaturierte RNA im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Detektion der RNA erfolgt ebenfalls unter UV-Lichtanregung.

#### **2.2.5.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit Hilfe der Gelextraktionskits „peqGold Gel Extraction Kit“ (PeqLab) und „Gene JET™ Gel Extraction Kit“ (Fermentas). Die Durchführung erfolgt dabei nach Angaben der Hersteller.

#### **2.2.5.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Eine Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure erfolgt durch Messung der Extinktion bei OD<sub>260nm</sub>. Dafür wird eine entsprechende Verdünnung im Spektralphotometer (BioPhotometer Plus, Eppendorf) gemessen. Wichtig für die Konzentrationsbestimmung ist das Beer-Lambert-Gesetz, wobei bei einer konstanten Schichtdicke (d) der Küvette die Extinktion proportional zur Konzentration der Lösung ist (Seibt, 2003).

$$c = E \times \epsilon^{-1} \times d^{-1}$$

c = Konzentration; E = Extinktion;  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient; d = Dicke der Küvette

Für den Extinktionskoeffizient gilt bei einer OD<sub>260nm</sub>:

ds DNA: 1 OD<sub>260nm</sub> = 50 µg/ml

ss DNA/ RNA: 1 OD<sub>260nm</sub> = 40 µg/ml

Anhand des Extinktionskoeffizienten kann die Konzentration der Nukleinsäuren mit Hilfe der OD<sub>260nm</sub> und der nachfolgenden Formel berechnet werden.

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Extinktionskoeffizient} [\mu\text{g/ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Weiterhin ist es möglich anhand einer spektralphotometrischen Analyse eine Aussage über eine Verunreinigung der DNA bzw. RNA mit Proteinen bzw. organischen Komponenten zu treffen. Dafür wird das Verhältnis OD<sub>260nm</sub> und OD<sub>280nm</sub> bzw. OD<sub>230nm</sub>

bestimmt. Aromatische Aminosäuren von Proteinen absorbieren Licht bei 280 nm, organische Komponenten bei 230 nm. Bei einer reinen DNA-Lösung sollte das Verhältnis  $A_{260}/A_{280} > 1,7$  und bei einer reinen RNA-Lösung bei 1,6-2,0 liegen. Das Verhältnis  $A_{260}/A_{230}$  sollte über 1,8 sein.

Alternativ kann eine Abschätzung der ungefähren DNA-Konzentration mittels Vergleich zu einem Größenstandard erfolgen. Dabei wird die DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit EtBr unter UV-Licht sichtbar gemacht und im Vergleich zu 5 µl eines quantitativen Größenstandards in verschiedenen Verdünnungen abgeschätzt. Wichtig sind dabei die Einzelintensitäten der DNA-Banden des verwendeten Größenstandards (vgl. Absatz 2.1.4).

### 2.2.6 Enzymatische Reaktionen

#### 2.2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction* (kurz PCR) bezeichnet eine enzymabhängige exponentielle Amplifikation eines DNA-Bereichs mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Mullis et al., 1986). Dabei müssen verschiedene Faktoren, wie beispielsweise Temperatur, Zeit und Magnesiumkonzentration optimal gewählt werden. Die Erweiterung (Elongation) des *Templates* erfolgt mittels Polymerase an den 3'-OH-Enden von Oligonukleotiden (Primern). Bei den Primern handelt es sich um kurze komplementäre Nukleotidsequenzen, die an dem zu amplifizierenden DNA-Bereich binden (*annealing*) können. Das *annealing* erfolgt bei einer für die Primer optimalen Temperatur, die sich mit der folgenden Formel (Rychlik & Rhoads, 1989) berechnen lässt:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Der erste Schritt bei einer PCR ist die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, welche durch eine Erhitzung bei 95°C für 5 min erfolgt. Es folgt ein Zyklus von 30-35 Wiederholungen aus Denaturierung, *annealing* und Elongation. Neu synthetisierte DNA-Doppelstränge werden für 30 Sekunden bei 95°C denaturiert, und das *annealing* der Primer erfolgt für 45 Sekunden bei der entsprechend berechneten Temperatur (s.  $T_m$ -Wert der vorangegangenen Formel). Die anschließende Elongation findet bei einer für die Taq-Polymerase optimalen Temperatur von 72°C statt. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Größe des zum amplifizierenden DNA-Bereichs, im Allgemeinen gilt pro Amplifikation von 1.000 Nukleotiden benötigt die Taq-Polymerase 1 min Reaktionszeit. Dieses Temperaturprofil wird mit Hilfe des „Mastercycler professional“ (Eppendorf) generiert.

Ein Standardansatz einer PCR mit der DNA-abhängigen Taq-Polymerase (New England Biolabs) beträgt 25µl:

2,5 µl	10x Reaktionspuffer (inkl. MgCl <sub>2</sub> )
2 µl	5'-Primer (10 µM)
2 µl	3'-Primer (10 µM)
0,5 µl	10 mM dNTP's
0,5 µl	Taq-Polymerase (5.000 U/ml)
2-100 ng	<i>Template</i> -DNA
x µl	dH <sub>2</sub> O

Die eingesetzte Menge an *Template* beträgt 2 ng Plasmid-DNA, 100 ng genomische DNA bzw. 5 µl purer oder 1:20 verdünnte cDNA (in dH<sub>2</sub>O). Eine Überprüfung des Amplicons erfolgt durch gelelektrophoretische Auftrennung eines Aliquots (5-12,5 µl) der Reaktion und anschließender Ethidiumbromidfärbung (s. Absatz 2.2.5.6).

#### **2.2.6.1.1 Kolonie-PCR**

Eine abgewandelte Form der PCR ist die Kolonie-PCR, bei der als *Template* eine Bakterienkolonie oder eine Suspension dieser eingesetzt wird (Zon et al., 1989). Mittels dieser PCR werden Bakterien auf eine vorangegangene Klonierung untersucht. Dafür können entweder Plasmid- oder Insertspezifische Primer verwendet werden.

Die Bakterien werden zunächst auf eine Replikationsplatte überimpft und anschließend als *Template* in 10 µl dH<sub>2</sub>O gelöst. Zu diesem *Template* werden 15 µl eines Mastermixes bei einem Gesamt-PCR-Volumen von 25 µl pipettiert. Als verwendetes Enzym wurde die „FIREPol Taq-Polymerase“ (Solis Biodyne) genutzt. Der Mastermix beinhaltet je 2,5 µl 10x Reaktionspuffer und MgCl<sub>2</sub> (25 mM), jeweils 2 µl 5'- und 3'-Primer (je 10 µM), sowie je 0,5 µl 10 mM dNTP's und FIREPol Taq-Polymerase (5.000 U/ml) und 5 µl dH<sub>2</sub>O. Das verwendete Temperaturprofil der PCR wird wie in 2.2.6.1 beschrieben ermittelt.

#### **2.2.6.1.2 Reverse Transkription (RT)**

Die Reverse Transkription (RT) beschreibt einen Amplifikationsprozess bei dem als Enzym eine RNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt wird (Sambrook et al., 1989). Dabei erfolgt die lineare Amplifikation eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) anhand von Gesamt-RNA oder mRNA als *Template*. Mit Hilfe dieser Reaktion ist es unter optimalen Bedingungen möglich, die Kopienzahl eines Genes in entsprechende cDNA-Kopien umzuschreiben.

Als Ansatzpunkt für die Reverse Transkriptase dienen entweder sequenzspezifische 3'-Primer (*antisense*) oder Oligo d(T)-Primer. Beim Verwenden von Oligo d(T)-Primern, binden diese komplementär an den polyadenylierten Bereichen der mRNA, wodurch bei guter RNA-Qualität die vollständige Reverse Transkription der mRNA möglich ist.

Standardmäßig wird für die RT das „QuantiTect Rev. Transcription Kit“ (Qiagen) genutzt. Als Ausgangsmaterial wird dabei 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Durchführung der Reversen Transkription erfolgt nach Angaben des Herstellers. Weiterhin wurden die RT-Kits „Sensiscript RT-Kit“ (Qiagen), der „SuperScript II Reverse Transcriptase“ (Invitrogen) und „Thermoscript“ (Invitrogen) verwendet. Die Nutzung der Kits erfolgt nach Anweisungen der Hersteller.

### 2.2.6.1.3 Quantitative PCR (qPCR)

Die Quantifizierung transkriptioneller Unterschiede nach Inhibitorbehandlungen oder RNAi-Experimenten mit adulten Schistosomen erfolgte durch quantitative PCRs (qPCR) im Anschluss an die cDNA-Synthese. Die Detektion neu synthetisierter DNA-Doppelstränge basiert dabei auf dem Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green (PerfeCTa® SYBR® Green Super Mix, Quanta). Dabei nimmt die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional mit jedem Zyklus zu und wird am Ende jedes Zyklus gemessen. Zur Überprüfung der Spezifität des Amplifikationsproduktes erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an jede qPCR. Durch die kontinuierliche Temperaturerhöhung kommt es zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges und dadurch zur Freisetzung von SYBR®Green, welche in der Abnahme der Fluoreszenzintensität resultiert. Anhand dieser Schmelzkurvenanalyse können die Fluoreszenzintensitäten des spezifischen PCR-Produkts und unspezifischen Primerdimeren unterschieden werden. Dabei besitzt das spezifische PCR-Produkt aufgrund seiner Größe einen höheren Schmelzpunkt als die unspezifischen Primerdimere. In jedem qPCR-Versuch wurde eine Standardkurve (Verdünnungsreihe des eluierten PCR-Produktes als *Template*) mitgeführt. Mittels dieser Standardkurve wird für jedes verwendete Primerpaar mit Hilfe der Steigung die Effizienz *E* der Amplifikation sowie der *Threshold* der Reaktion ermittelt. Bei dem *Threshold* handelt es sich um einen Schwellenwert der Fluoreszenzintensität, innerhalb der exponentiellen Amplifikation, der fixiert wird. Durch den *Threshold* ist die Bestimmung des  $C_t$ -Wertes für jede Probe der qPCR möglich. Mit dem  $C_t$ -Wert wird der Zyklus der Reaktion beschrieben, an dem das Fluoreszenzsignal der entsprechenden Probe den fixierten *Threshold* überschreitet (Dorak, 2008).

Für diese Arbeit wurden unterschiedliche Quantifizierungen (absolut und relativ) für die verschiedenen Experimente gewählt. Die Analyse von Transkriptionsunterschieden nach vorangegangener Behandlung mit Inhibitoren erfolgte durch eine absolute Quantifizierung

der Transkripte ausgewählter Gene. Die absolute Quantifizierung erfolgte in diesen Experimenten anhand der verwendeten Standardkurven. Als *Template* wurden dabei Geleluatverdünnungen des PCR-Produktes (jeweils um den Faktor 10 verdünnt) eingesetzt. Für jede Standardkurve wird eine Regressionsgerade für die Reaktion berechnet (s. nachfolgende Formel) und in einem „xy-Plot“ dargestellt.

$$y = mx + b$$

$$y = C_t; m = \text{Steigung der Geraden}; x = \log_{10} \text{ Menge an } \textit{Template}; b = y\text{-Achsenabstand}$$

Aus dieser Gleichung kann der Logarithmus der Menge an *Template* berechnet werden, wobei der dafür erhaltene Wert der Anzahl an Kopien pro Transkript entspricht.

$$x = (y-b)/m$$

Die Kopienzahl wird für alle verwendeten Proben berechnet und entlogarithmiert. Anschließend wurde für den Vergleich mit den Microarray-Daten das Verhältnis aus Behandlung und Kontrolle als Logarithmus zur Basis 2 berechnet (s. nachfolgende Formel) und grafisch dargestellt (Yun et al., 2006).

$$\log_2 \text{Ratio (Behandlung/Kontrolle)}$$

Als weitere Methode der Verifizierung von transkriptionellen Unterschieden wurde eine relative Quantifizierung für die RNAi-Experimente verwendet. Dabei wurde als endogene Kontrolle der  $C_t$ -Wert des Gens SmActin (Smp\_161930) für die verwendeten Proben bestimmt. Als Calibrator dienten Würmer, die ohne Zugabe von dsRNAs oder siRNAs elektroporiert wurden. Die Berechnung erfolgt anhand der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

$$\Delta C_t = C_t \text{ untersuchtes Gen} - C_t \text{ endogene Kontrolle}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ RNAi-Probe} - \Delta C_t \text{ Calibrator}$$

$$n\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

In einem Standardansatz der in dieser Arbeit durchgeführten qPCRs werden 10 µl PerfeCTa® SYBR® Green Super Mix (Quanta), 1 µl dH<sub>2</sub>O und jeweils 2 µl 5'- und 3'-Primer (in optimierter Konzentration) eingesetzt. Als *Template* dienen 1:20-Verdünnungen der entsprechenden cDNA. Die Reaktion erfolgt nach einem initialen Denaturierungsschritt für 3 min bei 95°C in 45 Zyklen bestehend aus 10 Sekunden 95°C, 15 Sekunden 60°C und 20 Sekunden 72°C. Die Schmelzpunktanalyse erfolgt ab 60°C bis 95°C.

### 2.2.6.1.4 *In vitro*-Mutagenese von Plasmid-DNA

Bei einer *in vitro*-Mutagenese erfolgt eine gezielte Mutation eines oder mehrerer nebeneinander liegender Nukleotide, wodurch ein Austausch einer oder mehreren Aminosäuren erfolgen kann. Die *in vitro*-Mutagenesen dieser Arbeit wurden mittels PCR durchgeführt, wobei in jedem Zyklus der PCR die gewünschten Mutationen des DNA-Doppelstrangs amplifiziert werden und damit eine hohe DNA-Menge mit den entsprechenden Mutationen generiert wird (Weiner et al., 1994). Bei dieser PCR werden eine aus *Pyrococcus furiosus* isolierte *proofreading* Polymerase sowie speziell designte Primer (vgl. Absatz 2.1.7) eingesetzt. Diese Primer enthalten nach Möglichkeit in der Mitte ihrer Sequenz die entsprechende Mutation sowie die Sequenz des Wildtyp-Plasmids, wodurch die Bindung der Primer an die Ausgangs-DNA gewährleistet ist. Die Anzahl der Fehlpaarungen zwischen den Primern und der DNA sollte nicht zu groß sein, damit die Primer während der PCR an die Wildtyp-DNA binden (*annealing*) können. Des Weiteren ist für Konzeptionierung der Primer eine Größe von 25 bis 41 Basen sowie ein GC-Gehalt von mindestens 40% optimal. Nach Angaben des QuickChange® Mutagenesis Kits (Stratagene) sollten der  $T_m$  der Primer bei  $\geq 78^\circ\text{C}$  liegen und wird wie folgt berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Fehlpaarungen$$

Dabei entspricht N der Anzahl an Basen des Primers, %GC dem prozentualen Anteil des GC-Gehalts der Primersequenz sowie %Fehlpaarungen den prozentualen Angaben der Fehlpaarungen (QuickChange® Mutagenesis Kits, Stratagene).

Die PCR wird durch einen initialen Denaturierungsschritt von 30 Sekunden bei  $95^\circ\text{C}$  gestartet. Es folgen 18 Zyklen bestehend aus 30 Sekunden  $95^\circ\text{C}$ , 1 min  $55^\circ\text{C}$  und x min  $68^\circ\text{C}$ , wobei x abhängig von der Größe der eingesetzten Plasmid-DNA (1 min pro kb) ist. Im Anschluss erfolgt ein 20-minütiger Schritt bei  $20^\circ\text{C}$ . Ein Standardansatz für eine *in vitro*-Mutagenese beträgt 50  $\mu\text{l}$ .

5 $\mu\text{l}$	10x Reaktionspuffer ( <i>Pfu</i> -Polymerase)
5 $\mu\text{l}$	5'-Primer (5 $\mu\text{M}$ )
5 $\mu\text{l}$	3'-Primer (5 $\mu\text{M}$ )
5 $\mu\text{l}$	2 mM dNTP's
1 $\mu\text{l}$	<i>Pfu</i> DNA Polymerase (3 U/ $\mu\text{l}$ )
25 ng	Template-DNA
x $\mu\text{l}$	dH <sub>2</sub> O

Im Anschluss an die PCR wird die Wildtyp-DNA durch einen *DpnI*-Verdau abgebaut (McClelland & Nelson, 1992). Dabei nutzt man eine spezielle Eigenschaft der Restriktionsendonuclease. Dieses Enzym erkennt spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, welche aus *dam*<sup>+</sup> Bakterienstämmen isoliert wird, d.h. die Wildtyp-DNA der PCR ist

(hemi)methyliert und wird durch den *DpnI*-Verdau restringiert, im Gegensatz zur neuamplifizierten DNA mit den gewünschten Mutationen. Dafür wird 1 µl *DpnI* (20 U/µl) direkt zu den PCR-Ansätzen gegeben und das Gemisch für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an den *DpnI*-Verdau kann der PCR-Ansatz direkt für eine Transformation in Bakterien genutzt werden (vgl. Kapitel 2.2.3.4).

### **2.2.6.2 Restriktionsanalysen von DNA-Sequenzen**

In der Molekularbiologie häufig genutzte Werkzeuge sind Restriktionsendonukleasen des Typs II. Dabei handelt es sich um Enzyme, die doppelsträngige DNA-Bereiche aufspalten (Sambrook et al., 1989).

Für einen Restriktionsansatz von 20 µl werden der enzyspezifische Reaktionspuffer (Endkonzentration 1x) sowie maximal 20-40 Units eines Restriktionsenzym eingesetzt. Als Ausgangsmenge an DNA verwendet man 1-5 µg Plasmid-DNA. Der Ansatz wird anschließend ad 20 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei einer für das Enzym optimalen Temperatur 2-3h inkubiert. Bei einem Restriktionsansatz mit mehreren Enzymen, die für eine optimale Reaktion unterschiedliche Puffer- oder Temperaturbedingungen benötigen, erfolgen die Restriktionen zunächst mit einem Enzym. Im Anschluss wird die DNA mit Phenol-Chloroform aufgereinigt, gefällt und nach dem Resuspendieren mit dem nächsten Enzym restringiert. Um den Erfolg des Restriktionsverdaus zu überprüfen, kann ein Aliquot der Reaktion auf einem Agarosegel überprüft werden (vgl. Abschnitt 2.2.5.6).

### **2.2.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Unter einer Ligation versteht man die enzymatisch bedingte Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphatrest und einer 3'-OH-Gruppe (Knippers, 2001). Das dabei verwendete Enzym ist die sogenannte Ligase (Sambrook et al., 1989). Für eine optimale Ligation wird ein 3:1 Verhältnis an Insert:Vektor eingesetzt. Mit Hilfe einer vereinfachten Formel lässt sich die Menge an Insert bei Verwendung von 50-100 ng Vektor ausrechnen (Qiagen, 2001):

$$\text{Insert-DNA [ng]} = (50 \text{ ng} \times \text{Insertgröße [bp]} \times \text{molaren Überschuss}) / \text{Vektorgröße [bp]}$$

Ein standardmäßig verwendeter Ligationsansatz umfasst 20 µl Gesamtvolumen. Als Ligase diente die T4 DNA-Ligase (Fermentas). Von diesem Enzym werden 1 Unit sowie 2 µl des 10x Reaktionspuffers verwendet. Nach Zugabe der entsprechend berechneten Mengen an Insert- und Vektor-DNA wird das Volumen mit dH<sub>2</sub>O ad 20 µl aufgefüllt. Die enzymatische Reaktion erfolgt für mindestens 30 Minuten bis üN bei 16°C.

### 2.2.6.3.1 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgt unter Verwendung des "Qiagen PCR Cloning Kits" (Qiagen, 2001). Bei dem im Kit enthaltenen Vektor handelt es sich um pDrive. Dieser besitzt 3'- und 5'- U-Überhänge und bietet sich für die Ligation von PCR-Produkten an, welche A-Überhänge besitzen. Das verwendete Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 10 µl. Die Durchführung der Reaktion erfolgt nach dem Herstellerprotokoll.

### 2.2.7 Quantifizierung der DNA-Synthese

Anhand der Quantifizierung der DNA-Syntheserate innerhalb eines definierten Zeitraumes lässt sich eine Aussage über die mitotische Aktivität machen. Grundlage für diese Methode ist in der vorliegenden Arbeit der Einbau des markierten Nukleotids BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) in neu synthetisierte DNA adulter Schistosomen *in vitro*, welches durch Verwendung eines anti-BrdU Antikörpers (Sigma) nachweisbar und durch den Vergleich der verwendeten Menge an Gesamt-DNA nach erfolgter DAPI-Färbung quantifizierbar ist (Knobloch et al., 2002b).

Für Experimente zur Quantifizierung der DNA-Syntheserate nach erfolgter Inhibitorbehandlung wurden adulte Schistosomen *in vitro* in M199-Medium für 48 h kultiviert, dem 1 mM BrdU zugesetzt war (vgl. Kapitel 2.2.2). Nach dieser Inkubationsdauer wurden die Schistosomen gesammelt, entpaart und die DNA der Männchen und Weibchen separat isoliert (s. Absatz 2.2.5.1). Von jeder isolierten DNA werden mindestens 800 ng durch *Slot-blotting* (vgl. Kapitel 2.2.8) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgt die Vorbereitung für die DAPI-Färbung. Dafür wird die Membran zunächst für 5 min bei Raumtemperatur in Lösung I gewaschen. Die Inkubation der Membran mit DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindol) erfolgt für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in Lösung II (+ DAPI, Endkonzentration 10 µg/ml). Aufgrund der Lichtsensitivität von DAPI wird für diesen Schritt eine lichtundurchlässige Box genutzt. Es folgen ein 5-minütiger Waschschriff mit dH<sub>2</sub>O und das Entfärben des Hintergrunds für 1-16h mit Lösung I, beide Schritte erfolgen ebenfalls lichtgeschützt. Das verwendete DAPI bindet selektiv an die DNA, wodurch die relative Menge membrangebundener DNA unter Fluoreszenz-Anregung durch UV-Licht detektiert werden kann. Nach erfolgreicher Detektion des DAPI-Signals, wobei sich die Intensität des Signals nicht in der Sättigung befinden darf, wird die Membran für 45 min mit 1x Roti-Block (Carl Roth) blockiert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation der Membran mit dem monoklonalen „Mouse anti-BrdU Antikörper“ (Sigma, 1:1.000 in ½ Roti-Block verdünnt) bei 4°C üN. Am folgenden Tag wird nicht gebundener Erst-Antikörper von der Membran gewaschen für 3x 10 min mit 1x PBS (+ 0,05% Tween 20). Es schließt sich die Inkubation mit einem „Sheep anti-Mouse Antikörper“ (Amersham, 1:12.000 in ½ Roti-Block verdünnt; HRP gekoppelt) für 2-3h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur an. Nach dieser



Inkubation wird die Membran erneut 3x für je 10 min mit 1x PBS (+ 0,05% Tween 20) gewaschen. Es folgt die Substratumsetzung mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Reagenz (Pierce, „ECL Western-Blotting Substrat“), welches als Substrat für die an den Zweit-Antikörper gekoppelte Peroxidase dient. Bei der Substratumsetzung durch die Peroxidase kommt es in diesem Bereich zur Chemilumineszenz, die nach Entfernen des Substrats durch eine Autoradiographie auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Um verschiedene Signalintensitäten zu detektieren, werden zu unterschiedlichen Expositionszeiten Autoradiographien erstellt.

Die Signalintensitäten der DAPI-Färbung und des Immunoblots werden mit Hilfe des Computerprogramms *Image J* verrechnet und das Verhältnis beider Signale zu einander gebildet (BrdU/DAPI).

### **2.2.8 Transfer von DNA auf eine Nitrocellulosemembran mittels *Slot-Blot***

Für den *Slot-Blot*-Transfer von DNA auf eine Nitrocellulosemembran wird die SRC 072/0 Minifold II (Schleicher & Schuell, Dassel)-Maschine verwendet. Der Aufbau des *Blots* erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die verwendete Nitrocellulosemembran wie auch die drei verwendeten Whatmanfilter werden vor dem *Blotten* mit 10x SSC angefeuchtet. Die zu transferierende DNA wird in mindestens 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen, in die *Slots* pipettiert und unter Vakuum auf die Membran transferiert. Um den Transfer zu optimieren, werden die *Slots* mit 50-100 µl dH<sub>2</sub>O nachgespült. Im Anschluss wird die Membran luftgetrocknet und die DNA durch *cross linking* (Stratalinker 2400, Stratagene) an die Membran gebunden.

### **2.2.9 RNA Interferenz in adulten Schistosomen**

Bei der RNA Interferenz (RNAi) wird die Transkriptmenge eines Gens durch den Einsatz von *double-stranded* (ds) RNAs oder *small interfering* (si) RNAs posttranskriptionell verringert (Fire, 2007). Die in dieser Arbeit verwendeten dsRNAs wurden mit Hilfe des „MEGAscript®RNAi-Kits“ (Ambion) hergestellt. Die Synthese der dsRNAs erfolgt dabei nach Anleitung des Herstellers. Neben dsRNAs wurden für diese Arbeit auch siRNAs verwendet, die von der Firma Riboxx synthetisiert wurden (vgl. Abschnitt 2.1.9).

Für die RNAi-Versuche werden 8-10 adulten Schistosomenpaare mit Hilfe des Gene Pulser XCell™ (Biorad) elektroporiert. Dabei werden die Würmer in eine 4 mm Küvette (Biorad) in 100 µl modifiziertem Elektroporationspuffer überführt, der 25 µg dsRNA oder 2,5 µg siRNA enthält. Die Elektroporation erfolgt durch Anlegen eines 125 V Einzelimpulses für 20 ms bei Raumtemperatur (Ndegwa et al., 2007; Krautz-Peterson et al., 2010). Im Anschluss werden die Würmer in M199-Kulturmedium überführt und 5 Tage *in vitro*

kultiviert (s. Kapitel 2.2.2), wobei an Tag 3 das Kulturmedium gewechselt wird. An Tag 5 werden die elektroporierten Würmer aufgeteilt und für morphologische Untersuchungen in AFA (vgl. Abschnitt 2.2.10) fixiert bzw. für transkriptionelle Analysen mit RNAlater (Ambion) versetzt und anschließend eingefroren (-80°C).

### **2.2.10 Morphologische Untersuchungen mittels *whole mount* Färbungen**

#### **2.2.10.1 Fixierung und Carminrot-Färbung adulter Schistosomen**

Die Fixierung adulter Schistosomen erfolgt durch Verwendung von AFA-Fixativ. Die Würmer werden in ca. 500 µl Fixativ überführt und für mindestens 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die in AFA fixierten Würmer werden in eine 96-Well-Platte überführt und für 30 min bei Raumtemperatur in Carminrot-Lösung (Machado-Silva et al., 1998; Neves et al., 2005; Beckmann et al., 2010b) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgt eine 2-5-minütige Entfärbung der Würmer durch Verwendung von saurem 70% igem Ethanol (+ 2,5% konz. HCl), dabei sollte die Färbung nicht zu stark ausgewaschen werden. Abschließend erfolgt die Dehydrierung der Schistosomen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100% Ethanol), sowie deren Einbettung in Kanadabalsam (Sigma).

#### **2.2.10.2 Morphologische Untersuchung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie**

Die Carminrot-gefärbten Schistosomen werden am konfokalen *Laserscanning* Mikroskop (KLSM, Leica TSC SP2) auf morphologische Veränderungen untersucht. Dabei wird im Reflektionsmodus mit einer 48% He/Ne-Laseranregung bei 488 nm gearbeitet. Die Detektion erfolgt durch einen 470 nm *long pass* Filter.

### **2.2.11 *In situ*-Hybridisierung adulter Schistosomen**

#### **2.2.11.1 Fixierung, Einbettung und Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten**

Adulte Schistosomen werden in Bouin-Fixativ für 90 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung erfolgt die Dehydrierung durch Inkubation von jeweils 45 min bei Raumtemperatur in einer aufsteigenden Alkoholreihe, 30% Ethanol (EtOH), 50% EtOH, 70% EtOH und 90% EtOH. Es folgt ein Inkubationsschritt in 96% EtOH, versetzt mit 2 Tropfen Chromotrop 2R, wodurch sich die Schistosomen rot anfärben. Am folgenden Tag werden die Würmer für 45 min in Methylbenzoat inkubiert und anschließend 2x 5 min mit Benzol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Würmer für 1-2h bei 60°C in Paraplast (Histowax) vorinkubiert und final in filtriertem Paraplast bei 60°C

ün inkubiert. Im Anschluss werden die Blöckchen bei Raumtemperatur abgekühlt und im trockenen Zustand bei 4°C gelagert. Für die *in situ*-Hybridisierungen werden 5 µm dicke Gewebeschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Jung HistoSlide 2000 R, Leica) hergestellt (Köster et al., 1988). Diese Gewebeschnitte werden auf silikonisierte Objektträger transferiert, am Mikroskop begutachtet und bei 60°C ün gebacken.

#### **2.2.11.2 Herstellung von Sonden für die *in situ*-Hybridisierung**

Die Lokalisierung der mRNA eines Gens erfolgt bei einer *in situ*-Hybridisierung über spezifische RNA-Sonden. Die verwendeten RNA-Sonden wurden für die durchgeführten Experimente mit Digoxigenin-markiert.

Für die *in situ*-Hybridisierungen wird ein etwa 400-600 bp großer, nicht konservierter Bereich eines Gens amplifiziert und kloniert (s. Kapitel 2.2.6.3.1). Die Amplifikation des Sonden-*Templates* erfolgt mit 1 pg - 1ng der entsprechenden Plasmid-DNA (pDrive, Qiagen) unter Verwendung Insert-flankierender T7- und Sp6-Primer. Von diesem PCR-Ansatz wird 1/10 zur Überprüfung der PCR elektrophoretisch aufgetrennt.

Es folgt die *in vitro* Transkription mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen Sp6 und T7. Die Reaktion erfolgt dabei in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37°C für 2h.

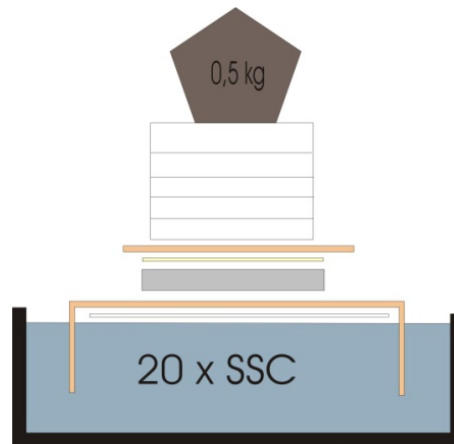
1 µg	PCR-Produkt
2 µl	10x Transkriptionspuffer (Roche)
2 µl	10x DIG-rNTP Labeling-Mix (Roche)
2 µl	SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)
0,5 µl	RNase-Inhibitor RNasin (40 U/µl)
x µl	DEPC-dH <sub>2</sub> O

Ein DNase-Verdau mit 1 Unit DNaseI (Fermentas) schließt sich für 20 min bei Raumtemperatur an. Zum Abstoppen der Reaktion werden 2 µl EDTA (Fermentas) hinzugegeben und die Sonden mit 1/10 Volumen 4 M Lithiumchlorid und 2,5 Volumen 96% DEPC-EtOH bei -80°C für mindestens 15-20 min gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt werden die RNA-Sonden mit 70% DEPC-EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert und luftgetrocknet. Die erhaltenen Sondenpellets werden in 20 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **2.2.11.3 Transkriptblot und Detektion von Digoxigenin-markiertem UTP**

Für die Überprüfung des Einbaus an DIG-markierten UTP in die Transkriptsonden wird von diesen Sonden ein 1 µl Aliquot auf ein Formaldehydgel (vgl. Absatz 2.2.5.6) aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel kurz in dH<sub>2</sub>O und für

15 min in 10x SSC gewaschen. Nach diesen Waschschritten erfolgt der Transfer der RNA-Sonden auf eine Nitrozellulose-Membran durch Verwendung eines Saugblots ün (Abb. 2-1).



**Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines Saugblots**

Der Transfer der RNA-Sonden mit eingebautem Digoxigenin-UTP erfolgt mit Hilfe des dargestellten Saugblots. Dabei werden die Sonden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Es wird ein Whatman-Filterpapier (orange) auf eine Glasplatte gelegt, in 20x SSC getränkt und das Formaldehydgel (grau) auf den feuchten Filter gelegt. Auf das Gel wird die Membran (gelb) luftblasenfrei gelegt und anschließend mehrere Lagen Whatman-Filter darauf positioniert. Für große Saugkraft wird ein Saugpapierstapel auf die Filter gelegt und mit einem Gewicht beschwert.

Für die Detektion des eingebauten DIG-UTPs wird die Membran zunächst getrocknet und die RNA durch *cross linking* an die Membran gebunden. Der Blot wird für 30 min mit 2% Blockierungslösung (Roche, gelöst in Maleinsäurepuffer) blockiert und anschließend mit einem „anti-Digoxigenin-Antikörper“ (Roche, 1:2.500 verdünnt in 2% Blockierungslösung, gelöst in Maleinsäurepuffer) für 30 min inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgen zwei 15-minütige Waschschriffe mit Maleinsäure + 0,3% Tween 20, zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper. Vor der Substratumsetzung erfolgt die Äquilibration des Blots für 5 min mit Substratpuffer. Für die Substratumsetzung durch die Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase werden 10 mg Naphthol-AS-Phosphat (Serva, gelöst in 200 µl DMSO) sowie 50 mg Fast Red TR (Sigma, gelöst in 50 ml Substratpuffer) dem Blot hinzugegeben. Durch Bindung des Antikörpers an eingebaute Digoxigenin-markierte UTPs kommt es in diesen Bereichen zu einer Rotfärbung des Blots. Dabei reagiert die an dem Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase mit dem Naphthol-AS-Phosphat und dem Fast Red. Die Reaktion wird durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O beendet.

#### **2.2.11.4 Vorbereitung und Hybridisierung der Gewebeschnitte**

Zum Entparaffinieren werden die Gewebeschnitte für 2x 5 min in Xylol inkubiert. Durch eine absteigende Alkoholreihe erfolgt die Rehydrierung der Präparate. Dafür werden die Schnitte 2x 5 min in absolutem EtOH und jeweils 5 min in 96% EtOH bzw. 70% EtOH inkubiert. Es folgt ein Waschschrift für 5 min in DEPC-dH<sub>2</sub>O und die Denaturierung basischer Proteine durch Inkubation für 20 min in 0,2 N HCl. Für die anschließende Proteinase K-Behandlung wird das Gewebe für 5 min in 37°C warmen Proteinase K-Puffer äquilibriert. Die Proteinase K-Behandlung erfolgt ebenfalls bei 37°C für 20 min in einer Konzentration von 1 µg/ml. Zum Abstoppen der Reaktion werden die Gewebeschnitte für 5 min in 0,2% ige Glycin-Lösung gegeben. Zum Reduzieren des Hintergrunds werden die Objektträger für 15 Sekunden mit 20% Essigsäure bei 4°C behandelt. Es folgen eine Inkubation in 1x PBS für 5 min, die Prähybridisierung für 15 min in 20% Glycerol und ein kurzer Waschschrift mit 2x SSC. Die Denaturierung der Gewebeschnitte sowie der Sonden erfolgt durch Erhitzen für 10-12 min auf 70°C und unmittelbares Abkühlen.

Das Sondengemisch enthielt pro 200 µl Ansatz für einen Objektträger:

1:100	Sonde
1:50	t-RNA (33 mg/ml)
1:100	Heringssperma (10 mg/ml)
1:100	DEPC-dH <sub>2</sub> O

Der Hybridisierungspuffer enthielt für einen 5 ml Ansatz:

2,5 ml	deionisiertes Formamid
1,25 ml	20x SSC
5 µl	Tween 20
50 µl	100x Denhardts
1 ml	DEPC-dH <sub>2</sub> O

Die Hybridisierung der Sonden auf die Gewebeschnitte erfolgt bei 42°C in einer feuchten Kammer üN. Pro Objektträger wurden 200 µl Sondengemisch (gemischt mit dem Hybridisierungspuffer) hinzugegeben.

#### **2.2.11.5 Waschen der Gewebeschnitte und Detektion der Transkripte**

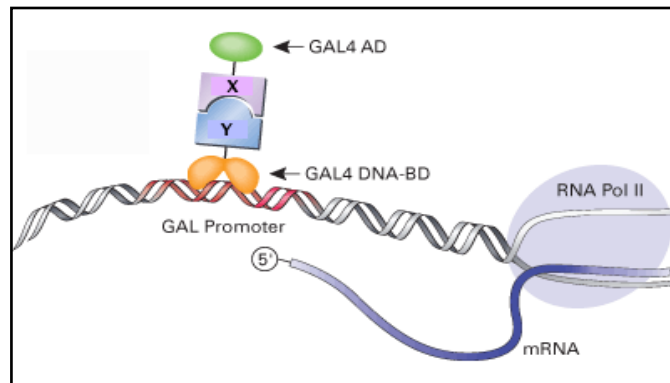
Um nach der Hybridisierung nicht gebundene Sonden zu entfernen, werden die Gewebeschnitte für je 15 min mit 2x SSC + 0,1% Tween 20 (bei 42°C), 1x SSC und 0,5x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Die Schnitte werden für 5 min mit Maleinsäurepuffer für die anschließende Blockierung äquilibriert und dann für 30 min mit 4% Blockierungslösung

(Roche, gelöst in Maleinsäurepuffer) in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgt die Inkubation mit 200 µl „anti-Digoxigenin-Antikörper“, 1:500 verdünnt (Roche, in 2% Blockierungslösung, gelöst in Maleinsäurepuffer). Dafür werden die Schnitte für 2-3h bei Raumtemperatur oder üN bei 4°C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wird durch zweimaliges Waschen mit Maleinsäurepuffer entfernt (jeweils 20 min) und das Gewebe für die Substratumsetzung für 5 min mit Substratpuffer äquilibriert. Die Substratumsetzung erfolgt wie in Kapitel 2.2.11.3 bereits beschrieben. Für eine dauerhafte Aufbewahrung werden die Präparate mit AquaTex eingedeckelt.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgt an dem Mikroskop CX-21 (Olympus) mit der SC30 Kamera (Olympus) und durch Verwendung der *cellSens Dimension Software* (Olympus) werden die Präparate digitalisiert.

### 2.2.12 Yeast Two/Three-Hybrid Experimente

Eine Möglichkeit zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* stellen *Yeast Two-Hybrid* (Y2H)-Systeme dar (Fields & Sternglanz, 1994). Das in dieser Arbeit verwendete System basiert auf dem Matchmaker GAL4 *Two-Hybrid* System (Clontech, 2002). In diesem Fall stehen die Reportergene *lacZ*, *HIS3* und *ADE2* unter der Kontrolle von GAL4-abhängigen Elementen, dabei handelt es sich um einen Minimalpromotor bestehend aus TATA-Box und *upstream activating sequences* (UAS). Die UAS dienen hier als Bindestelle des GAL4-Transkriptionsfaktors (TF). Dieser besteht aus 2 Domänen, der DNA-Bindedomäne (GAL4 DNA-BD) und der Transkriptions-Aktivierungsdomäne (GAL4 AD). Für die Untersuchung von Protein-Interaktionen werden die beiden Untereinheiten getrennt und als Fusionsproteine mit den zu untersuchenden Proteinen exprimiert (vgl. Abb. 2-2, Protein X und Y). Kommt es dabei zur Interaktion der Fusionsproteine und damit zur Annäherung der beiden TF-Untereinheiten, wird der TF rekonstruiert und die Transkription der Reportergene initiiert. In diesem Fall kann eine Wachstumsselektion auf die Reportergene *HIS3* (Histidin) und *ADE2* (Adenin) durchgeführt werden. Für einen Y2H-Ansatz werden auxotrophe Hefestämme verwendet (z. B. AH109 oder Y187), die diese Aminosäuren nicht ohne den komplettierten GAL4-TF synthetisieren können. Durch Expression beider Aminosäuren ist eine Wachstumsselektion dieser Hefezellen möglich. Dabei wachsen ausschließlich die Hefen, in denen der GAL4-TF durch eine Protein-Protein-Interaktion rekonstruiert wird.



**Abbildung 2-2: Prinzip des GAL4-basierten Yeast Two-Hybrid Systems**

Der GAL4-Transkriptionsfaktor (TF) besteht aus der DNA-Bindedomäne (GAL4 DNA-BD) und der Transkriptions-Aktivierungsdomäne (GAL4 AD). Beide Untereinheiten werden als Fusionsproteine mit zwei weiteren Proteinen (X und Y) exprimiert. Bei einer Interaktion zwischen den Proteinen X und Y werden die GAL4 AD und GAL4 DNA-BD in physikalische Nähe gebracht, wodurch der GAL4-TF funktionsfähig ist. Es kommt zur Bindung des TFs an den GAL Promotor und der Initiation der Transkription verschiedener Reportergene. (modifiziert nach Clontech; [www.clontech.com](http://www.clontech.com))

Als Vektor mit der kodierenden Sequenz für die GAL4 DNA-BD (540 bp) wurde pBridge (Clontech) verwendet. Dieser hat eine Größe von 6,5 kb und besitzt 2 *multiple cloning sites* (MCS), wodurch sich der Vektor für einen *Yeast Three-Hybrid* (Y3H) Ansatz eignet (s. pBridge Datenblatt, Clontech). Als Vektoren, welche die kodierende Sequenz der GAL4 AD (338 bp) beinhalten, wurden pGADT7-Rec (Clontech; 8059 bp groß) oder pACT2 (Clontech; 8,1 kb groß) genutzt. Diese Vektoren wurden für die unterschiedlichen Klonierungen verwendet (s. Abschnitt 2.1.8).

Die verwendeten Vektoren besitzen weitere Wachstumsselektionsmarker, pBridge beinhaltet die Sequenz des *TRP1* Gens, welches die Aminosäure Tryptophan (Trp) kodiert. Die GAL4 AD Vektoren pGADT7-Rec und pACT2 hingegen beinhalten die kodierende Sequenz des Gens *LEU2*, welches für die Expression von Leucin notwendig ist. Anhand dieser beiden Gene erfolgt nach einer Co-Transformation (vgl. 2.2.4.5) die erste Wachstumsselektion. Anschließend wird durch Verwendung von dreifach-Selektionsmedium (SD-Leu/-Trp/-His) der Selektionsdruck auf die Wachstumsselektions-positiven Hefekulturen erhöht. Gegebenenfalls kann der Selektionsdruck weiter verstärkt werden durch Verwendung von vierfach-Selektionsmedium (SD-Leu/-Trp/-His/-Ade). Diese Wachstumsselektion ist jedoch nur bei Verwendung der Hefezellen des Stammes AH109 möglich.

#### **2.2.12.1 $\beta$ -Galaktosidase Kolonie-Filterassay**

Bei einem  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Kolonie-Filterassay werden Protein-Protein-Interaktionen mittels Umsetzung des Substrats X-Gal identifiziert (Breedon & Nasmyth,

1985). Die Spaltung des X-Gals erfolgt durch die  $\beta$ -Gal, die nur in Hefezellen exprimiert wird, in denen die GAL4-Fusionsproteine miteinander interagieren und dadurch den GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstruieren sowie das *lacZ*-Reportergen exprimieren (vgl. Abschnitt 2.2.12).

Mit Hilfe dieser Methode können viele Wachstumsselektions-positive Klone untersucht werden. Die Hefekolonien werden auf Selektionsmedium (SD-Leu/-Trp/-His-Platten) für 2-4 Tage angezogen. Die gewachsenen Klone werden auf einen Whatman-Filter übertragen und durch einen „freeze & thaw“-Zyklus permeabilisiert. Nach dem Auftauen der Hefezellen auf dem Filter, wird dieser mit der Kolonieseite nach oben auf einen Z-Puffer/X-Gal-getränkten Filter gelegt und für die enzymatische Reaktion der  $\beta$ -Gal bei 30°C für maximal 8h inkubiert. Durch Spaltung des X-Gals entsteht unter Sauerstoffzufuhr bei  $\beta$ -Gal exprimierenden Hefen eine Blaufärbung, d.h. diese Hefezellen beinhalten miteinander interagierende Proteine.

### 2.2.12.2 $\beta$ -Galaktosidase Flüssigassay

Um eine Protein-Protein-Interaktion im Y2H-System zu quantifizieren, führt man zur Überprüfung weniger Hefeklone einen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Flüssigassay durch (Clontech, 2002). Dafür wird beispielsweise ONPG (Sigma,  $\sigma$ -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) als Substrat der  $\beta$ -Gal verwendet. Dieses wird durch das Enzym in  $\sigma$ -Nitrophenol und D-Galaktose gespalten und als gelbliche Färbung sichtbar.

Für diesen Assay werden von einer 5 ml Flüssigkultur (30°C, 200 rpm,  $\mu$ N, in SD-Medium) 2 ml in Vollmedium (1x YPD) überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Kultur werden 3 Aliquots mit je 1,5 ml entnommen, zentrifugiert und die erhaltenen Zellpellets mit je 1,5 ml Z-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellpellets in jeweils 300  $\mu$ l Z-Puffer aufgenommen. Von jeder 300  $\mu$ l Hefesuspension werden 100  $\mu$ l-Aliquots entnommen und in neue Reaktionsgefäße überführt (Aufkonzentrierung der Suspension mit dem Faktor 5). Zum Aufschluss der Zellen erfolgen 3 „freeze & thaw“-Zyklen. Zusätzlich wird ein 100  $\mu$ l Aliquot Z-Puffer als *blank*-Probe entnommen. Zu den Proben werden 0,7 ml Z-Puffer +  $\beta$ -Mercaptoethanol (270  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol pro 100 ml Z-Puffer) hinzugegeben. Für den Start der enzymatischen Reaktion erfolgt die Zugabe von 160  $\mu$ l ONPG-Lösung (4 mg/ml, in Z-Puffer gelöst). Für die Dauer der Umsetzung des ONPGs wird die exakte Zeit gemessen. Die Reaktion erfolgt bei 30°C. Zum Abstoppen der Reaktion werden 0,4 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zu den Proben gegeben, die Zellen für 10 min zentrifugiert und die Absorption des Überstands bei 420 nm photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 420 nm wird das Licht dabei durch das gebildete  $\sigma$ -Nitrophenol am stärksten absorbiert.



Die relativen Protein-Protein-Interaktionsstärken können durch Berechnung der  $\beta$ -Gal Units bestimmt werden (Miller, 1972; Miller, 1992). Dabei entspricht eine  $\beta$ -Gal Unit der Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol ONPG innerhalb einer Minute in einer Zelle hydrolysiert.

$$\beta\text{-Gal Units} = 1.000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

$t$  = Inkubationszeit in Minuten

$V$  = eingesetztes Volumen von 0,1 ml mit Konzentrationsfaktor von 5 (s. o.)

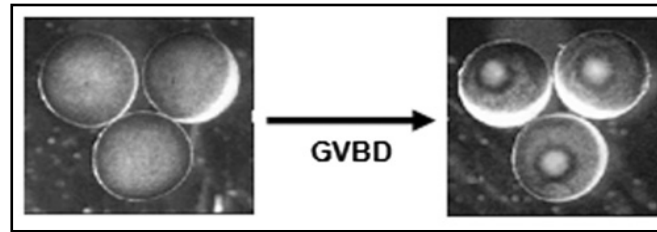
$\text{OD}_{420}$  = gemessene Absorption des  $\sigma$ -Nitrophenols bei 420 nm

$\text{OD}_{600}$  = gemessene Absorption der  $\mu$ N-Flüssigkultur bei 600 nm

### **2.2.13 Germinal Vesicle Breakdown-Analysen**

Die in dieser Arbeit vorgestellte *Germinal Vesicle Breakdown*-Analyse zur Überprüfung der spezifischen Inhibition von SmT $\beta$ RI durch den Einsatz von TRIKI (s. Kapitel 3.1.1) wurden in Kollaboration mit Dr. Colette Dissous (CIIL – Center for Infection and Immunity der Universität Lille, Frankreich), Dr. Katia Cailliau und Dr. Edith Browaeys (Laboratoire de Régulation des Signaux de Division der Universität Lille, Frankreich) durchgeführt.

Für diese Versuche wurde der entsprechende Bereich von SmT $\beta$ RI (vgl. Abschnitt 3.1.1) in den pcDNA 3.1/V5-His B-Vektor (Invitrogen) kloniert und nach Frankreich versandt. Dort erfolgt die Linearisierung der Plasmid-DNA sowie die *in vitro* Transkription mit dem „T7 mMessage m Machine Kit“ (Ambion) zur Synthese von cRNA. Von dieser cRNA werden jeweils 60 ng in die äquatoriale Region von *stage* VI Oocyten von *Xenopus laevis* injiziert (Browaeys-Poly et. al, 2000). Die Oocyten befinden sich dabei im Übergang zwischen der G2- und M-Phase der ersten Meiose und können beispielsweise durch Stimulation mit dem natürlichen Induktor Progesteron ihre weitere Entwicklung durchlaufen. Dabei aktiviert Progesteron eine MAPK-Signalkaskade, die ihrerseits den sogenannten *Germinal Vesicle Breakdown* (GVBD) auslöst, welcher durch die Entstehung eines weißen Punktes am animalen Pol der Oocyten gekennzeichnet ist (s. Abb. 2-3; Haccard et al., 1995). Die verwendeten Oocyten werden bei 19°C im ND96-Medium inkubiert und nach einer Dauer von 18h kommt es zum GVBD. Als Positivkontrollen werden Oocyten verwendet, die mit Progesteron behandelt werden, als Negativkontrollen dienen uninjizierte Oocyten.



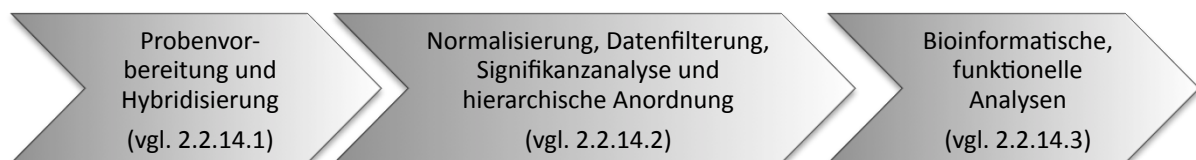
**Abbildung 2-3: Veränderung der Oocyten infolge des *Germinal Vesicle Breakdowns* (GVBD)**

Oocyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* werden für einen GVBD genutzt. Dabei kommt es durch Stimulation mit z.B. Progesteron zum GVBD. Dieser ist durch die Ausbildung eines weißen Punktes der Oocyten am animalen Pol gekennzeichnet. Links: Oocyten von *X. laevis*; Rechts: Oocyten von *X. laevis* nach einem GVBD (modifiziert nach Long et al., 2010)

Um die spezifische Wirkung des Inhibitors TRIKI auf SmT $\beta$ RI zu testen, wurde das *X. laevis* Oocyten-System genutzt. Zunächst wurden in den Oocyten zwei verschiedene Varianten des Moleküls exprimiert und diese Oocyten auf das Auslösen eines GVBDs untersucht. Nach beobachteten GVBDs wurden erneut Oocyten mit den cRNAs injiziert und diese Oocyten ebenfalls für 18h in ND96-Medium inkubiert, wobei dem Medium unterschiedliche Konzentrationen (3 nM, 30 nM, 300 nM) an TRIKI zugesetzt wurden. Nach dieser Inkubation wurde der Anteil an Oocyten mit erfolgten GVBDs bestimmt.

### 2.2.14 Microarray Experimente

Für die Microarray Experimente wurden Schistosomen-spezifische 44k Oligoarrays (Agilent) verwendet, die bereits in der Vergangenheit für unterschiedliche Fragestellungen erfolgreich genutzt wurden (Verjovski-Almeida et al., 2007; Oliveira et al., 2012). Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte kurz erläutert (Abbildung 2-4).



**Abbildung 2-4: Fließdiagramm der einzelnen Arbeitsschritte der Microarray-Analyse**

Die Probenvorbereitung beinhaltet alle Abläufe der *in vitro* Kultivierung, der RNA-Isolierung bis zur Amplifikation markierter cRNA-Proben. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der markierten cRNAs an die plattformgebundenen Oligonukleotide (Oligosonden). Nach diesem Prozess werden die Fluoreszenzsignale der hybridisierten cRNA-Proben gemessen, normalisiert und auf differentielle Transkription untersucht. Dabei werden die Daten gefiltert und statistisch ausgewertet und anschließend mit dem Programm

*Spotfire* hierarchisch angeordnet (Kaushal & Naeve, 2004). Um einen Überblick differentiell transkribierter Gene zu erhalten, werden funktionelle Analysen mit den bioinformatischen Programmen *Gene Ontology* (GO; Ashburner et al., 2000) und *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA; Thomas & Bochev, 2010) durchgeführt.

#### **2.2.14.1 Probenvorbereitungen und Hybridisierung**

Adulte Schistosomen wurden 2 Tage *in vitro* kultiviert und in diesem Zeitraum mit Herbimycin A, TRIKI, der Kombination beider Inhibitoren oder DMSO als Kontrolle behandelt (vgl. Abschnitt 2.2.2.1). Dabei wurden täglich das Medium und die Inhibitoren gewechselt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Schistosomen entpaart und die Weibchen separat für die RNA-Isolation eingefroren. Die nachfolgenden Experimente wurden in Kollaboration mit Dr. Sergio Verjovski-Almeida und Dr. Katia C. Oliveira im Instituto de Quimica, Universidade de São Paulo in Brasilien durchgeführt.

Die aus behandelten Weibchen isolierte RNA wurde einem DNase-Verdau (DNase I, RNeasy Mini-Kit, Qiagen) unterzogen, anschließend mittels „RNeasy Mini-Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und ihre Qualität mit Hilfe des 2100 Bioanalyzer (Agilent) überprüft. Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Es folgt die Markierung der isolierten RNAs (300 ng) mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cyanin3 (Cy3) bzw. Cyanin5 (Cy5). Hierzu wurde das „Quick Amp Labeling Kit, Two-Colors“ (Agilent) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Positivkontrollen für die Markierung und späteren Hybridisierung werden sogenannte Spike-RNAs aus dem „RNA Spike-In Kit, Two-Colors“ (Agilent) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für den Markierungsprozess wird die RNA zunächst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend *in vitro* transkribiert, wobei der Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe stattfindet. Je Ansatz (Inhibitor- bzw. Kontrollbehandlung) werden sowohl eine Cy3 wie auch Cy5 markierte cRNA hergestellt, welche die sogenannten *dye swap*-Kontrollen darstellen, die als technische Replikate dienen. Anschließend wurden die cRNAs mittels „Illustra RNAspin Mini Kits“ (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Qualität der markierten cRNAs wurde am NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer überprüft.

Die Hybridisierung der Microarrays erfolgt mit je 825 ng cRNA einer inhibitor-behandelten Wurmgruppe in Kombination mit einer Kontrollgruppe. Der Hybridisierungsprozess findet unter Verwendung des „Microarray Hybridization Chamber Kits“ (Agilent) bei 65°C für 17h unter Rotation statt (Agilent, 2007). Je Ansatz wurden insgesamt sechs cRNAs, aus drei unabhängigen biologischen Experimenten mit jeweils einem technischen Replikat (*dye swap*), verwendet. Nach der Hybridisierung werden die Microarrays gewaschen und die Fluoreszenzsignale mit dem Gene Pix 4000B Scanner (Molecular Devices) gemessen (Agilent, 2007).

### **2.2.14.2 Normalisierung, Datenfilterung, Signifikanzanalyse und hierarchische Anordnung**

Die Datenextraktion erfolgt mit Hilfe der *Feature Extraction Software* (Agilent Technologies). Dabei werden Standardeinstellungen des Scanners zum Messen der Fluoreszenzintensitäten von 4x 44k Oligoarrays gewählt (Agilent, 2007). Mittels dieser Software werden die Dateien „Processed Signal“ und „Is Pos(itiv) and Sig(nificant)“ erstellt. Erstere beinhaltet die mit Hilfe eines LOWESS-Algorithmus normalisierten Intensitätswerte (Quackenbush, 2002). Die Datei „Is Pos an Sig“ enthält eine Signifikanzauswertung der gemessenen Intensitätswerte in Relation zur Fluoreszenz des Hintergrunds. Hierbei erhält jede Oligosonde eines Ansatzes entsprechend der verwendeten cRNAs sechs 0- bzw. 1-Werte, wobei 0 einer geringeren Fluoreszenzintensität als der Hintergrundfluoreszenz und 1 einer stärkeren Fluoreszenzintensität entspricht. Während der Datenfilterung der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Oligosonden hinsichtlich ihres Transkriptionsprofils ausgewertet, die in mindestens einer der beiden Konditionen (Behandlung oder Kontrolle) in 4 von 6 Fällen einen Wert 1 aufwiesen.

Nach der Datenfilterung erfolgte ein Abgleich der Daten mit einer überarbeiteten Annotation (Oliveira et al., 2011) des verwendeten Microarrays (Verjovski-Almeida et al., 2007). Im Zuge dieses Abgleichs entfallen Redundanzen, da pro Gen nur noch eine repräsentative Oligosonde ausgewählt wird (Oliveira et al., 2011). Anhand der Datei „Processed Signal“ werden mit dem Programm *R* die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der Behandlung zur Kontrolle als Logarithmus der Basis 2 ( $\log_2$ Ratios (Behandlung/Kontrolle)) für alle 6 Replikate pro Ansatz berechnet und die Datei „LogRatios-all processed signals“ erstellt.

Die  $\log_2$ Ratios (Behandlung/Kontrolle) der gefilterten Oligosonden werden anschließend für die Signifikanzanalyse mit dem Excel Plug-In „*Significance Analyses of Microarrays*“ (SAM) genutzt (Tusher et al., 2001). In dieser Arbeit wurde dabei eine „one class“-Analyse einzeln für alle Inhibitorstudien durchgeführt (SAM „Users guide and technical document“). Dabei wird überprüft, ob sich die Mittelwerte der  $\log_2$ Ratios (Behandlung/Kontrolle) von 0 unterscheiden, d.h. eine signifikante, differentielle Transkription vorliegt. In dieser Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von  $q \leq 0,03$  für die weiteren Analysen der drei Inhibitorstudien verwendet. Dieses Niveau wurde gewählt, da es eine höhere Stringenz aufweist als das Minimum von  $q \leq 0,05$ . Anschließend wird durch Erstellen von hierarchischen Anordnungen der einzelnen Replikate mit Hilfe des Programms *Spotfire* die Vergleichbarkeit der Replikate zueinander überprüft (Kaushal & Naeve, 2004; Kaushal & Naeve, 2005).

### 2.2.14.3 Bioinformatische, funktionelle Analyse

Die mit den Microarray-Analysen generierten Daten werden mit den bioinformatischen Programmen *Gene Ontology* (GO) und *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) in Funktionsgruppen sortiert. Dafür wurde ein weiterer Abgleich mit der aktualisierten Annotation (Oliveira et al., 2011) für die signifikant differentiell transkribierten Gene durchgeführt. Bei diesem Abgleich erhalten die Oligosonden den Zusatz „verwendbar für die GO“ bzw. „verwendbar für die IPA“, wenn sie verschiedenen Kriterien entsprechen. Um den Zusatz „verwendbar für die GO“ zu erhalten, müssen die repräsentativ ausgewählten Oligosonden eine *sense*-Orientierung zu den annotierten Genen besitzen. Bei den Oligosonden mit dem Zusatz „verwendbar für die IPA“ handelt es sich um annotierte Gene, deren putative Homologe bereits bekannte Proteine des Menschen kodieren. Entsprechende Gene sollten in BlastX-Analysen einen e-Wert  $< 1 \times 10^{-10}$  sowie eine Deckung von mindestens 60% mit dem humanen Homolog aufweisen (Oliveira et al., 2011).

Mit Hilfe der GO werden auf Grundlage charakterisierter Gene und Genprodukte verschiedener Organismen differentiell transkribierte Gene in Subkategorien der Ontologien „Biologischer Prozess“, „Molekulare Funktion“ und „Zelluläre Komponente“ unterteilt (Ashburner et al., 2000). Als Referenzpopulation werden Gene genutzt, die nach Abschluss des Filterungsprozesses den Zusatz „verwendbar für die GO“ erhalten hatten. Als Studienpopulation dienten die Gene, die neben diesem Kriterium einen  $q \leq 0,03$  in SAM besaßen. Die Anordnung der GO-Subkategorien erfolgte mittels der *Parent-Child-Union* (Grossmann et al., 2007). Das verwendete Signifikanzniveau der Kategorisierung lag bei einem *Threshold* von  $p \leq 0,05$  nach Benjamini-Hochberg Korrektur (Benjamini et al., 2001). Die GO wurde mit Hilfe des Programms *Ontologizer* durchgeführt (Robinson et al., 2004).

Auf der Basis von Sequenzvergleichen untersucht das Programm IPA die Zugehörigkeit differentiell transkribierter Gene zu zellulären Netzwerken und konservierten Signalwegen (Thomas & Bochev, 2010). Netzwerke bezeichnen die regulatorischen Beziehungen zwischen einzelnen Genen. Ein weiterer Algorithmus der IPA analysiert, ausgehend von den transkriptionellen Veränderungen einzelner Gene das Vorhandensein spezifischer Transkriptionsfaktoren sowie deren Aktivität (aktiviert oder inaktiv). Für die IPA wurden die Gene genutzt, die in SAM als  $q \leq 0,03$  detektiert wurden und den Zusatz „verwendbar für die IPA“ besaßen. Bei den identifizierten Netzwerken wurden die Einstellungen „140 Moleküle pro Netzwerk“ und „Anzahl der Netzwerke:10“ gewählt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Inhibitorbehandlung von adulten Schistosomen und anschließende morphologische sowie transkriptionelle Analysen

Innerhalb der letzten Jahre wurde eine Vielzahl an Signaltransduktionsmolekülen in *S. mansoni* identifiziert und charakterisiert. Eines dieser Moleküle ist das Homolog des TGF $\beta$  Rezeptors Typ I (SmT $\beta$ RI; Smp\_049760; *Accession* Nr. AF031557; Davies et al., 1998). In verschiedenen Studien konnten als Interaktionspartner dieses Moleküls weitere hoch konservierte Mitglieder des TGF $\beta$ -Signalwegs identifiziert werden, so auch der Activin Rezeptor Typ II (SmRK2; Smp\_080120.x; *Accession* Nr. AY550912; Forrester et al., 2004), unterschiedliche T $\beta$ RI-Substrate wie die Smad-Moleküle SmSmad4 (Smp\_033950; *Accession* Nr. AY371484; Osman et al., 2004) und SmSmad2 (Smp\_085910; *Accession* Nr. AF215934; Beall et al., 2000; Osman et al., 2001), sowie ein FK506 Bindung Protein 12 (FKBP12; Smp\_079230; *Accession* Nr. AY118110; Rossi et al., 2002). Letzteres kolokalisiert mit dem Rezeptor u.a. in den Vitellinzellen und Oocyten (Knobloch et al., 2004). Diese Lokalisationsstudien weisen auf eine mögliche Signaltransduktion des TGF $\beta$ -Signalwegs innerhalb der Reproduktionsorgane adulter Schistosomen hin. Abhängig vom Zelltyp kann dieser Signalweg unterschiedliche Funktionen besitzen (Moustakas & Heldin, 2009; Massagué, 2000). So kann die Proliferation eukaryotischer Zellen durch verschiedene Proteine der TGF $\beta$ -Familie stimuliert, aber auch inhibiert werden (Yang & Moses, 2008). Aufgrund dieser Funktionsvielfalt und der Lokalisation verschiedener Moleküle des schistosomalen TGF $\beta$ -Signalwegs innerhalb der Reproduktionsorgane war die Identifizierung der Funktion des Signalweges in *S. mansoni* von großem Interesse und stand bereits in der Vergangenheit im Mittelpunkt unterschiedlicher Arbeiten (Beall & Pearce, 2001; LoVerde et al., 2007; Knobloch et al., 2007).

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Funktion von Molekülen ist der Einsatz von spezifischen Inhibitoren. Als Untersuchungsmodell diente ein *in vitro* Kultursystem, welches erstmals von Basch (1981) zur Kultivierung adulter Schistosomen erfolgreich eingesetzt wurde. Zusätzlich kann an diesen *in vitro* kultivierten Parasiten beispielsweise auch deren Genexpression untersucht werden (Grevelding et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Funktionsuntersuchung des SmT $\beta$ RI der TGF $\beta$  RI Kinase-Inhibitor (TRIKI; Calbiochem) ausgewählt. Dieser Inhibitor wirkt als selektiver ATP-Kompetitor der Serin/Threonin-Kinasedomäne vom humanen T $\beta$ RI und inhibiert diesen mit einem IC<sub>50</sub> von 51 nM (Sawyer et al., 2003).

Ein weiteres Signalmolekül, dessen Funktion für *S. mansoni* untersucht wurde, ist die bereits identifizierte zelluläre Src-Tyrosinkinase SmTK3 (Smp\_151300; *Accession* Nr. AJ585205, Kapp et al., 2004). Transkripte dieser Kinase wurden in den Reproduktions-

organen adulter Schistosomen detektiert und mittels *Yeast Two/Three-Hybrid* (Y2/3H) Analysen wurden verschiedene Protein-Interaktionspartner identifiziert (Knobloch et al., 2007; Quack et al., 2009; Beckmann et al., 2010a, Beckmann et al., 2010b, Beckmann et al., 2011). Aufgrund des Einfluss von humanen zellulären Tyrosinkinasen auf den Zellzyklus, sowie auf Proliferations- und Differenzierungsprozesse (Thomas & Brugge, 1997; Hubbard & Till, 2000) und der Lokalisation von SmTK3 innerhalb der Reproduktionsorgane wurden erste funktionelle Untersuchungen dieses Moleküls durchgeführt (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007). Für diese Experimente wurde das Antibiotikum Herbimycin A (Herb A; Enzo Life Science) ausgewählt, das Tyrosinkinasen wie die humane Src-Kinase p60<sup>v-Src</sup> mit einem IC<sub>50</sub> von 0,9 µM inhibiert (Uehara et al., 1989a; Uehara et al., 1989b; Fukazawa et al., 1991).

Knobloch et al. (2007) beschäftigten sich bereits im Vorfeld mit funktionellen Studien für die Moleküle SmTβRI und SmTK3 in Form von Inhibitorbehandlungen adulter Schistosomen *in vitro*. Für diese Studien wurden die Inhibitoren TRIKI und Herb A sowohl einzeln als auch in Kombination genutzt. Beide Komponenten führten *in vitro* zu keiner Beeinflussung der Paarungsstabilität, jedoch zu deutlichen physiologischen Veränderungen der Schistosomenweibchen, wie eine dosierungsabhängige Reduktion der mitotischen Aktivität (Knobloch et al., 2007). Daneben wurde ebenfalls eine dosierungsabhängige Reduktion der Eiproduktion bestimmt. Im direkten Vergleich der Effekte dieser Behandlungen wurde jeweils der moderate Einfluss auf die Physiologie durch TRIKI, ein deutlich stärkerer durch Herb A und der stärkste Effekt durch Kombination beider Wirkstoffe gefunden. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein Einfluss von SmTβRI und damit des schistosomalen TGFβ-Signalwegs, sowie von SmTK3 auf Differenzierungsprozesse des Weibchens, die wahrscheinlich aufgrund der Lokalisationen von SmTβRI und SmTK3 innerhalb der Reproduktionsorgane erfolgen, sowie der Eisynthese postuliert. Des Weiteren deutete der additive Effekt der Kombination beider Inhibitoren auf eine Verknüpfung des TGFβ- und Src-Kinasen Signalwege an diesen Prozessen hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Funktionsuntersuchungen für die Signaltransduktionsmoleküle SmTβRI und SmTK3 von adulten Schistosomen *in vitro* durchgeführt. Im Fokus standen dabei die Auswirkungen von Inhibitorbehandlungen auf morphologische und transkriptionelle Veränderungen. Daneben wurden die physiologischen Parameter „mitotische Aktivität“ und „Eiproduktion“ mit bereits vorhandenen Daten verglichen.

### **3.1.1 Überprüfung der Inhibition von SmTβRI durch TRIKI anhand von *Germinal Vesicle Breakdown*-Analysen im *Xenopus*-Oocyten-System**

Um die spezifische Inhibition des schistosomalen TβRI durch Verwendung des Inhibitors TRIKI zu testen, wurde sowohl eine konstitutiv aktive als auch inaktive Variante





Das für T $\beta$ RI charakteristische GS-Motiv beider Organismen ist vollständig identisch (\* , Position 284-290, grau hinterlegt) im Vergleich von *S. mansoni* und *H. sapiens*. Von den hoch konservierten Threoninen der Positionen 299 und 303 ist bei *S. mansoni* nur das der Position 299 vorhanden. Das Threonin an Position 303 ist durch ein Glutamin ersetzt, wie es auch für eine Vielzahl von Typ I Rezeptoren der TGF $\beta$ -Superfamilie beschrieben wurde (Wieser et al., 1995). Durch gezielte *in vitro*-Mutagenesen des GS-Motivs 284-290 sowie der konservierten Aminosäuren Threonin (Position 299) und Glutamin (Position 303) ist die konstitutive Inaktivierung bzw. Aktivierung des Rezeptors möglich. Dafür werden die Aminosäuren entweder für die inaktive Form des Rezeptors gegen Valine und Alanine (SmT $\beta$ RI<sup>VVAAAVV</sup>), oder für die konstitutiv aktive Form werden die Serine, Threonine und Glutamin gegen Asparaginsäure (SmT $\beta$ RI<sup>7D</sup>) ausgetauscht (Wieser et al., 1995). Durch zielgerichtete *in vitro*-Mutagenesen wurden die entsprechenden Aminosäuren ausgetauscht und der Erfolg der *in vitro*-Mutagenesen durch Sequenzierungen überprüft.

Die hergestellten SmT $\beta$ RI-Konstrukte wurden schließlich für die Expression der Kinase-Varianten in *X. laevis* Oocyten verwendet. Wie erwartet wurde nach Expression der inaktiven Form des SmT $\beta$ RI (SmT $\beta$ RI<sup>VVAAAVV</sup>) kein GVBD ausgelöst (vgl. Abbildung 3-2). Im Gegensatz dazu führte die Expression der aktiven Kinase (SmT $\beta$ RI<sup>7D</sup>) in 80% bzw. 90% der Oocyten in zwei unabhängigen Experimenten zum Auslösen des GVBDs. Die nicht injizierten Oocyten zeigten, wie erwartet, als Negativkontrollen keinen GVBD (Daten nicht gezeigt). Anhand dieser Experimente wurde das Oocyten-System als geeignetes Modell für die funktionelle Untersuchung der Kinaseaktivität des SmT $\beta$ RI bestätigt. Um die Inhibition des Rezeptors unter Verwendung von TRIKI zu überprüfen, wurden erneut SmT $\beta$ RI<sup>7D</sup>-exprimierende Oocyten in TRIKI-haltigem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen für 18h inkubiert.

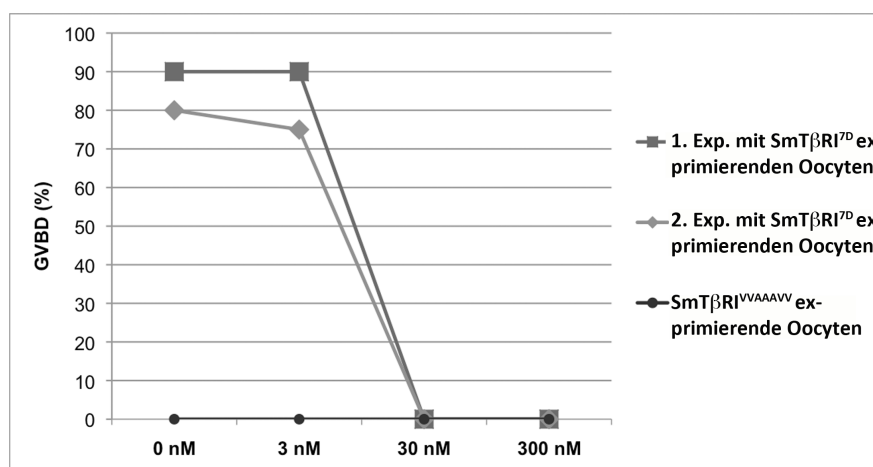


Abbildung 3-2: *Germinal Vesicle Breakdown*-Experimente TRIKI behandelter Oocyten, die eine konstitutiv aktive (SmT $\beta$ RI<sup>7D</sup>) oder inaktive (SmT $\beta$ RI<sup>VVAAAVV</sup>) Variante des SmT $\beta$ RI exprimieren

Prozentuale Bestimmung der *Xenopus laevis* Oocyten die einen ausgelösten *Germinal Vesicle Breakdown* (GVBD) zeigten, in denen entweder SmT $\beta$ RI<sup>7D</sup> (1. Experiment: dunkelgraue Quadrate, 2. Experiment: hellgraue Rhomben) oder SmT $\beta$ RI<sup>VVAAAVV</sup> (1. Experiment: anthrazitfarbene Kreise) exprimiert wurde. Die Oocyten wurde in Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 3 nM, 30 nM und 300 nM) an TRIKI inkubiert.

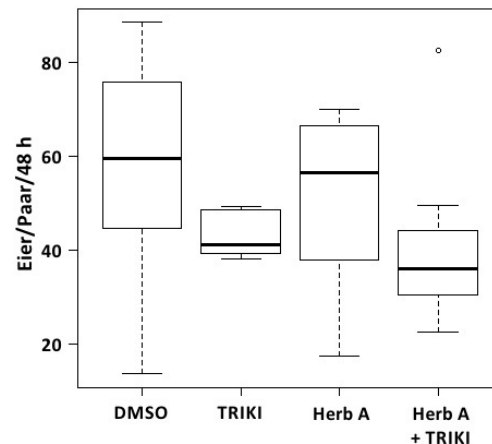
Wie der Abbildung 3-2 zu entnehmen ist, inhibiert TRIKI den SmT $\beta$ RI-induzierten GVBD konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 3 nM TRIKI wurde zum einen in 90% und zum anderen in 75% der verwendeten Oocyten ein GVBD ausgelöst. Durch Erhöhung der TRIKI-Konzentration auf 30 nM oder 300 nM, wurde das Auslösen eines GVBDs vollständig inhibiert. Das heißt, ab einer Konzentration von 30 nM TRIKI ist die Kinasedomäne des SmT $\beta$ RI vollständig in *X. laevis* Oocyten blockiert.

Mit Hilfe dieser Experimente wurde gezeigt, dass die schistosomalen Moleküle SmT $\beta$ RI und SmTK3 durch geringe Konzentrationen an TRIKI, bzw. Herb A in ihrer Aktivität in *X. laevis* Oocyten inhibiert werden. Um die Funktion beider Moleküle in adulten Schistosomen zu untersuchen, wurden entsprechende *in vitro* Kultur Versuche durchgeführt.

### **3.1.2 *In vitro* Kulturexperimente adulter Schistosomen unter Verwendung der Inhibitoren TRIKI und Herbimycin A**

Erste *in vitro* Behandlungen adulter Schistosomen mit 4,5  $\mu$ M Herb A, 150 nM und 300 nM TRIKI, bzw. der Kombination beider Inhibitoren in den genannten Konzentrationen, führten zu einer signifikant reduzierten mitotischen Aktivität der behandelten Weibchen (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007). Ferner wurde eine dosierungsabhängige Reduktion der Eiproduktion für die Behandlung mit TRIKI, sowie eine verstärkte Reduktion bei Verwendung von Herb A bzw. der Kombination beider Inhibitoren festgestellt.

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit adulte Schistosomenpaare für 48 h mit diesen Inhibitoren *in vitro* behandelt und für morphologische Untersuchungen und Transkriptomanalysen verwendet. Als Kontrolle der Inhibitorbehandlungen wurden erneut die Anzahl der Eier pro Paar, sowie die mitotische Aktivität bestimmt (s. Abb. 3-3, Abb. 3-4, Abb. 3-5).

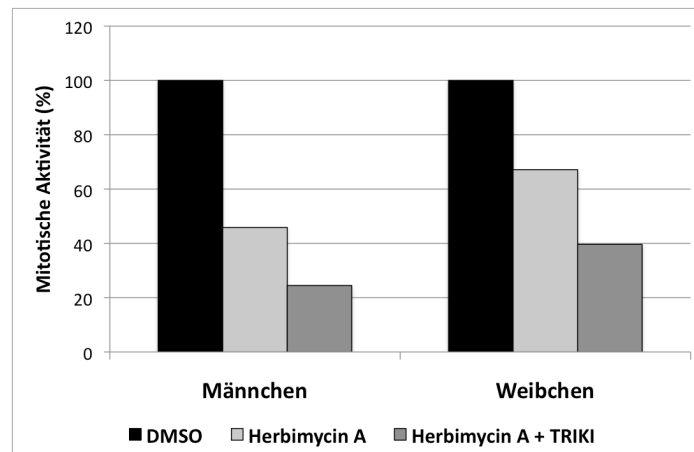


**Abbildung 3-3: Ermittelte Eizahl pro Schistosomenpaar pro 48 h nach entsprechender Inhibitorbehandlung**

Boxplot der Eizahl pro behandeltem Schistosomenpaar nach 48 Stunden Behandlung mit DMSO als Kontrolle, TRIKI (300 nM), Herbimycin A (Herb A; 4,5  $\mu$ M) oder der Kombination beider Inhibitoren (300 nM TRIKI und 4,5  $\mu$ M Herb A). Pro Behandlung wurden die Werte von sechs biologischen Replikaten bestimmt (n=6). Whiskers (gestrichelte Linie): Extremwerte der Eizahl nach entsprechender Behandlung; Box: mindestens 50% der ermittelten Eizahlen; Schwarzer Balken: Mittelwert der bestimmten Eizahlen pro Paar; Kreis: Ausreißer

Die Abbildung 3-3 zeigt für die Kontrolle (DMSO) dieser Experimente eine mittlere Eizahl von 58 pro Paar, dabei wurde eine Streuung der Eizahlen (Box) im Bereich von 45 bis 75 gefunden. Weiter wurde die stärkste Streuung von Extremwerten (Whiskers) für diese Behandlung ermittelt. Die mittlere Eizahl nach Behandlung mit TRIKI lag bei 42 pro Schistosomenpaar, diese Werte schwankten im Bereich von 39 bis 48. Im Vergleich zu dieser Behandlung wurden erneut große Schwankungen der Eizahl pro Paar für die Behandlungen mit Herb A, bzw. der Kombination beider Inhibitoren gefunden. Die mittlere Eizahl für Herb A-behandelte Paare lag bei 58 mit Schwankungen im Bereich von 38 bis 68 sowie starken abweichenden Extremwerten. Für die Kombinationsbehandlung wurde eine mittlere Eizahl von 37, sowie starke Schwankungen im Bereich von 31 bis 43 bestimmt. Ferner wurden entsprechende Extremwerte und ein Ausreißer (82 Eiern pro Paar) für diese Behandlung ermittelt. Diese Abbildung verdeutlicht die großen Schwankungen der Eiproduktion nach 48 h.

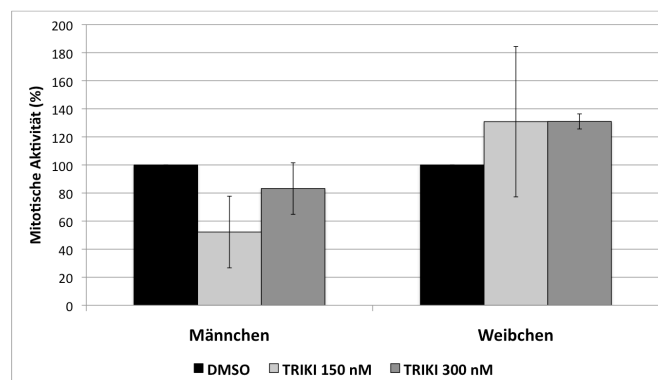
Mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA; Armstrong et al., 2000) sollte überprüft werden, ob sich die ermittelten Eizahlen signifikant voneinander unterscheiden. Anhand der F-Verteilung dieser Varianzanalyse konnten im Gegensatz zu den älteren Daten von Knobloch et al. (2007) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Eizahlen der einzelnen Behandlungen zur Kontrolle festgestellt werden. Daher wurden als zusätzlicher Richtwert für den Erfolg der Inhibitorbehandlung die mitotische Aktivität einzelner Experimente bestimmt (Abb. 3-4, Abb. 3-5).



**Abbildung 3-4: Mitotische Aktivität nach vorangegangener Behandlung mit Herbimycin A, bzw. der Kombination von Herbimycin A und TRIKI**

Die berechnete mitotische Aktivität (%) ist separat für behandelte Männchen und Weibchen angegeben. Die Behandlungsdauer der Schistosomenpaare *in vitro* betrug 48 h. Dabei wurden diese Experimente einmal durchgeführt (n = 1). Schwarz: mitotische Aktivität nach DMSO-Behandlung (als 100% gesetzt); hellgrau: mitotische Aktivität nach Herb A-Behandlung; dunkelgrau: mitotische Aktivität nach Kombinationsbehandlung.

Bei Behandlung mit Herbimycin A wurde eine Reduktion der mitotischen Aktivität der Männchen auf 46% und der Weibchen auf 67% ermittelt (Abbildung 3-4). Bei der Kombinationsbehandlung wurde die Reduktion der mitotischen Aktivität verstärkt, d.h. die Männchen zeigten eine mitotische Aktivität von 24% und die Weibchen von 40%. Die für die Weibchen ermittelten Ergebnisse entsprachen tendenziell den von Knobloch et al. (2007). Im Gegensatz zu den älteren Daten (Knobloch et al., 2007) wurde in der vorliegenden Arbeit die mitotische Aktivität der Männchen nach diesen Inhibitorbehandlungen beeinflusst.



**Abbildung 3-5: Mitotische Aktivität nach vorangegangener Behandlung mit TRIKI**

Die berechnete mitotische Aktivität (%) ist separat für behandelte Männchen und Weibchen angegeben. Die Behandlungsdauer der Schistosomenpaare *in vitro* betrug 48 h. Die Ergebnisse von zwei Experimenten wurden gemittelt und deren Standardabweichung eingefügt (n = 2). Schwarz: mitotische Aktivität nach DMSO-

Behandlung (als 100% gesetzt); hellgrau: mitotische Aktivität nach TRIKI-Behandlung (150 nM); dunkelgrau: mitotische Aktivität nach TRIKI-Behandlung (300 nM).

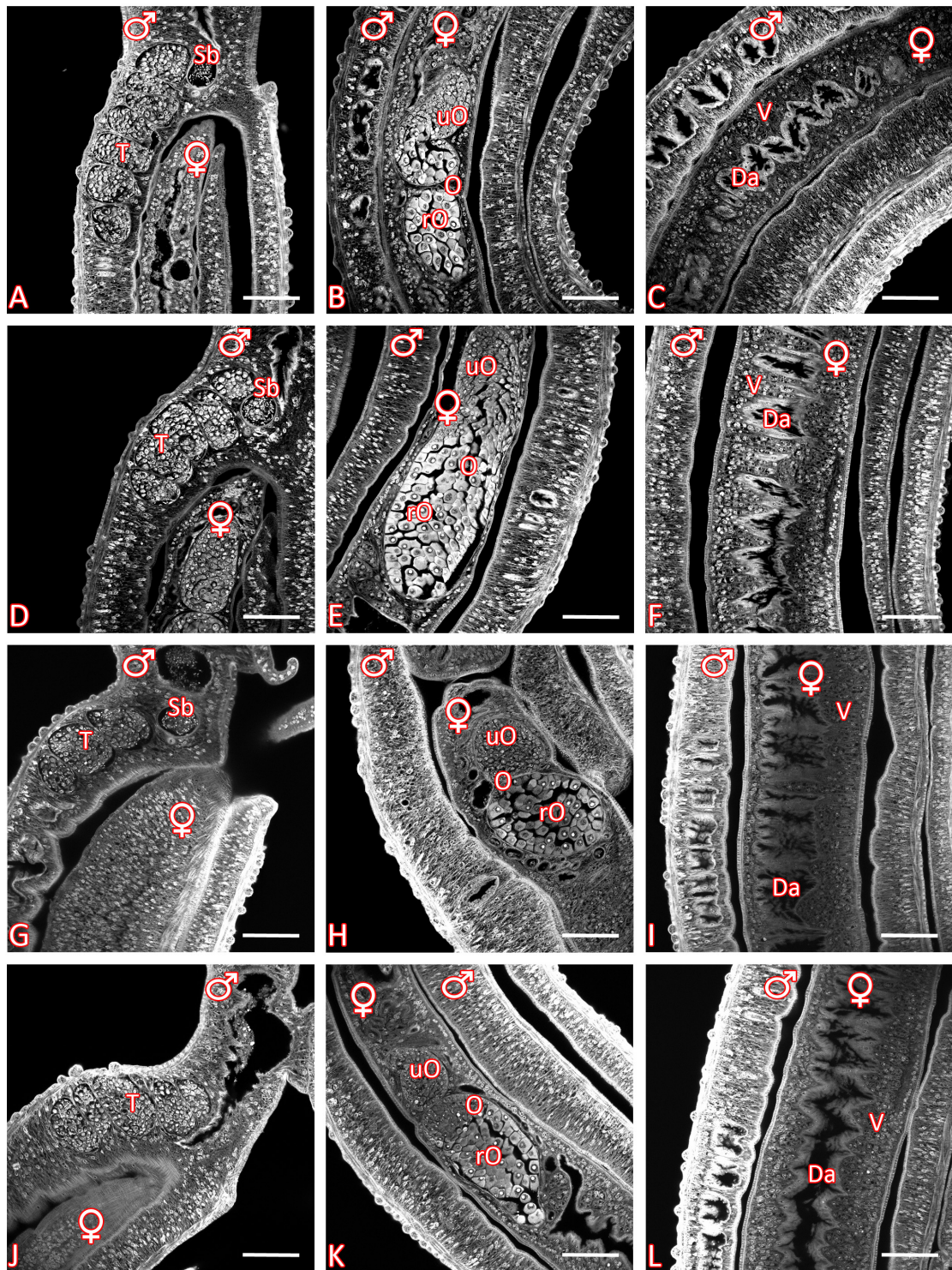
Die mitotische Aktivität TRIKI behandelter Männchen lag bei 52% (150 nM), bzw. 83% (300 nM) im Vergleich zur Kontrolle (100%). Wie auch für die Behandlung mit Herb A bzw. der Kombination beider Komponenten wurden in diesen Versuchen eine veränderte mitotische Aktivität der Männchen ermittelt. Im Vergleich dazu stellten Knobloch et al. (2007) keine signifikanten Veränderungen der mitotischen Aktivität TRIKI-behandelter Männchen fest. Weitere Unterschiede zu den veröffentlichten Daten stellen die Erhöhungen der mitotischen Aktivität TRIKI-behandelter Weibchen (150 nM und 300 nM) auf jeweils 131% dar. Bei der Behandlung der Weibchen mit 150 nM TRIKI wurden starke Streuungen der Einzelwerte gefunden, erkennbar anhand der Standardabweichung. Vergleichend mit den Daten von Knobloch et al. (2007) wurden bei der Wiederholung dieser Experimente mit der gleichen Methode starke Abweichungen zwischen den Ergebnissen gefunden. Aus diesem Grund sind zukünftig Wiederholungen der Versuche unbedingt notwendig. Unabhängig von diesen technischen Problemen konnte gezeigt werden, dass beide Inhibitoren die mitotische Aktivität beeinflussen.

### 3.1.3 Morphologische Untersuchungen adulter Schistosomen nach vorangegangenen Inhibitorbehandlungen

Grundlage für die folgenden morphologischen Untersuchungen war die veränderte mitotische Aktivität inhibitorbehandelter Würmer (Knobloch et al., 2007 und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit). Als das Organ mit der stärksten mitotischen Aktivität wurde das Vitellarium identifiziert (Den Hollander & Erasmus, 1984). Aufgrund der inhibitorbedingten Veränderungen der mitotischen Aktivität wurde eine deutliche Veränderung der Morphologie dieses Organs erwartet. Zusätzlich wurde eine morphologische Veränderung innerhalb der Reproduktionsorgane adulter Schistosomen erwartet, da sowohl Transkripte von SmT $\beta$ RI als auch von SmTK3 in diesen Organen mittels *in situ*-Hybridisierungen lokalisiert wurden (Knobloch et al., 2004; Kapp et al., 2004).

Für detaillierte morphologische Studien wurden Schistosomen mit den Inhibitoren TRIKI (300 nM) und Herb A (4,5  $\mu$ M) in Kombination und als Einzelbehandlung *in vitro* inkubiert. Es wurde eine Inkubationsdauer von 48 h gewählt, um mögliche morphologische Veränderungen, die einen längeren Zeitraum zur vollständigen Ausprägung benötigen, detektieren zu können. Nach dieser Behandlung wurden die Würmer in AFA-Lösung fixiert, anschließend mit dem Farbstoff Carminrot gefärbt (Machado-Silva et al., 1998; Neves et al., 2005; Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2010c) und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (vgl. Kapitel 2.2.10, s. Abb. 3-6).



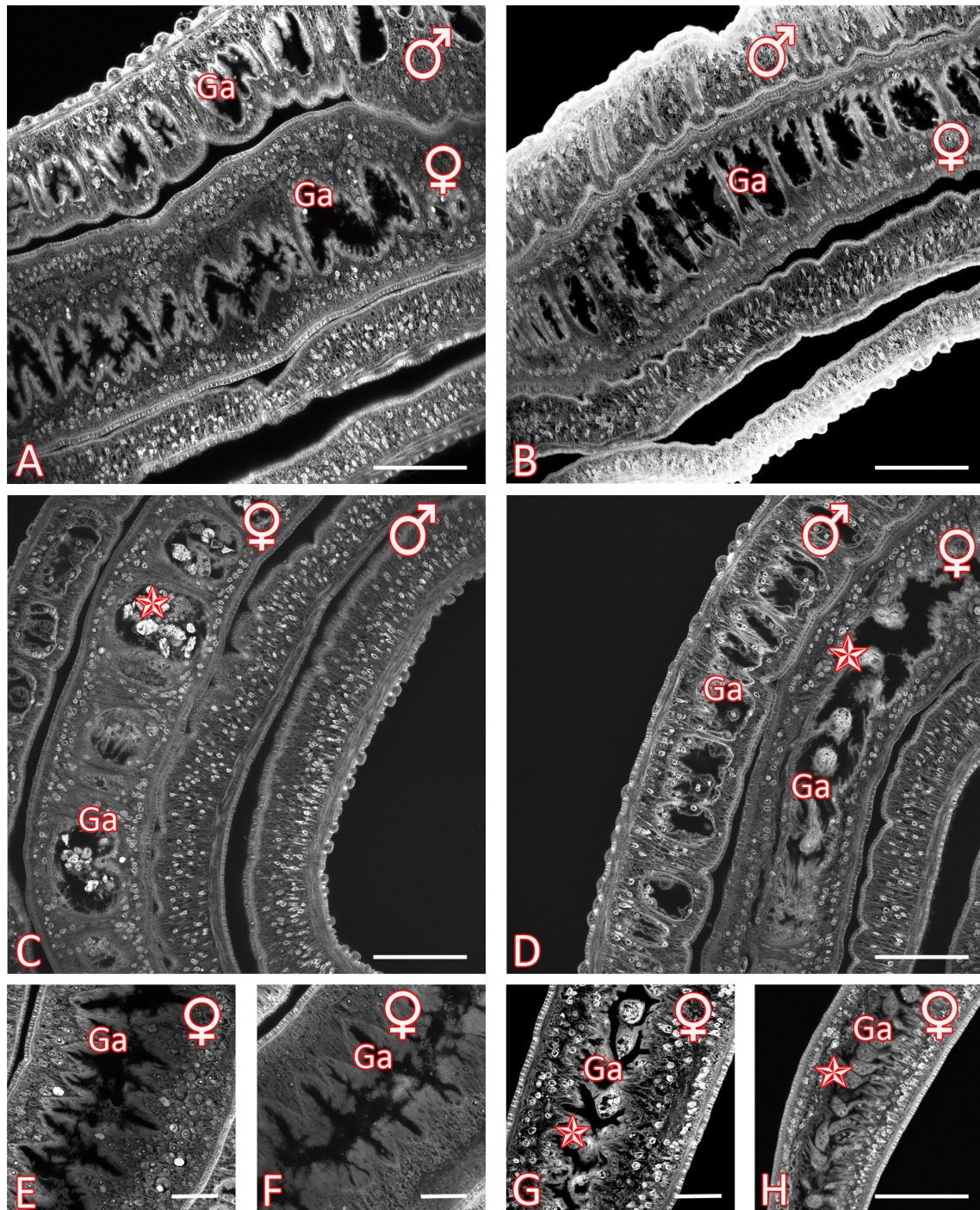


**Abbildung 3-6: Mikroskopische Untersuchungen der Reproduktionsorgane nach 48-stündiger Behandlung mit DMSO, TRIKI, Herbimycin A oder der Kombination beider Inhibitoren**

Die *in vitro* behandelten Schistosomenpaare wurden nach 48 h in AFA fixiert, mit Carminrot gefärbt und anschließend am KLSM Leica TCS SP2 im Reflektionsmodus untersucht. Die Bilder zeigen Reproduktionsorgane nach unterschiedlichen Behandlungen. A-C: DMSO-Behandlung (Kontrolle); D-F: TRIKI-Behandlung (300 nM); G-I: Herb A-Behandlung (4,5 µM); J-L: Kombinationsbehandlung (4,5 µM Herb A + 300 nM TRIKI). Scale bar: 75 µm [T: Testes; O: Ovar; uO: unreife Oocyten; rO: reife Oocyten; Sb: Samenblase; V: Vitallerium; Da: Darm; ♀: Weibchen; ♂: Männchen]

Bei vergleichender Betrachtung der Reproduktionsorgane der Würmer der Kontrollbehandlung (A-C) mit denen der TRIKI- (D-F), Herb A- (G-I), bzw. Kombination von TRIKI und Herb A- (J-L) Behandlung wurde keine morphologische Veränderung in diesen Organen gefunden. Allerdings zeigten inhibitorbehandelte Schistosomen bereits nach einem Behandlungszeitraum von 24 h (Knobloch et al., 2007) sowie auch 48 h eine Veränderung der mitotischen Aktivität im Vergleich zur Kontrollpopulation. Um die Ausbildung einer möglichen phänotypischen Veränderung zu gewährleisten, wurde der Behandlungszeitraum auf max. 7 Tage erweitert. Bei Inkubation mit Herb A wurde nach einem Zeitraum von 5 Tagen beobachtet, dass die Würmer eine stark verringerte Vitalität aufwiesen. Dieser Befund wurde anhand einer verschlechterten Peristaltik des Darms und einer steigenden Entpaarungsrate definiert. Diese Effekte verstärkten sich bei Kombination beider Inhibitoren. Zusätzlich wirkte die Kombinationsbehandlung *in vitro* ab einem Zeitraum von 5 Tagen für viele Würmer letal. Im Vergleich zu diesen Behandlungen konnte die Behandlung mit TRIKI auf bis zu 7 Tage ausdehnt werden, ohne dass eine verringerte Vitalität der Würmer beobachtet wurde. Um mögliche Effekte der TRIKI-Behandlung zu verstärken, wurde der Inhibitor zusätzlich in erhöhten Konzentrationen (500 nM und 1  $\mu$ M) eingesetzt. Da erst ab einer Behandlungsdauer von 5 Tagen die ersten Veränderungen der Vitalität beobachtet wurden, werden erst ab diesem Zeitpunkt mikroskopische Bilder in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3-7). Deutliche morphologische Veränderungen konnten im Darmtrakt behandelter Schistosomen beobachtet werden.





**Abbildung 3-7: Mikroskopische Untersuchungen des Darmtrakts inhibitorbehandelter Schistosomen nach einer Behandlungsdauer von 5 und 6 Tagen**

Die *in vitro* behandelten Schistosomenpaare wurden nach der Behandlung in AFA fixiert, mit Carminrot gefärbt und anschließend am KLSM Leica TCS SP2 im Reflektionsmodus untersucht. Die Bilder zeigen den Darmtrakt nach unterschiedlichen Behandlungen. Die Behandlung erfolgte für 5 Tage (A-D) mit DMSO (A), 300 nM TRIKI (B), 4,5 µM Herb A (C) und der Kombination von 300 nM TRIKI und 4,5 µM Herb A (D). Bei der Behandlung für einen Zeitraum von 6 Tagen (E-H) wurden entweder 500 nM TRIKI (E), 1 µM TRIKI (F), 4,5 µM Herb A (G) oder die Kombination aus 300 nM TRIKI und 4,5 µM Herb A (H) genutzt. *Scale bar*: 75 µm (A-D, H) und 29 µm (E-G) [Ga: Gastrodermis; Stern: Abschnürungen der Gastrodermis; ♀: Weibchen; ♂: Männchen]



Wie bei der Inhibitorbehandlung für einen Zeitraum von 48 h wurden auch bei Verlängerung der Behandlung die Reproduktionsorgane auf morphologische Veränderungen untersucht (Daten nicht gezeigt). Es wurden nach den Inhibitorbehandlungen keine Veränderungen festgestellt. Überraschenderweise prägte sich eine phänotypische Änderung in der Gastrodermis nach entsprechender Langzeitbehandlung mit Herb A (C, G), bzw. der Kombinationsbehandlung (D, H) aus. Die Gastrodermis ist ein syncytiales, dickes Gewebe, das den Darm umschließt (Kontrollbehandlung, A). Bei Behandlung mit TRIKI für 5 Tage mit 300 nM (B) ist dieses Gewebe unverändert. Durch Erhöhung der Konzentration und Inkubationsdauer (E: 6 Tage mit 500 nM und F: 6 Tage mit 1  $\mu$ M) wurden ebenfalls keine Veränderung der Gastrodermis im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die Herb A-behandelten Würmer zeigten hingegen in einigen Fällen nach 5 Tagen eine auffällige Ablagerung im Darm (C). Bei weiterer Kultivierung für 6 Tage wurden Abschnürungen der Gastrodermis in Form von Bläschen gefunden (G). Eine Vielzahl der Würmer zeigten nach 5 Tagen der Kombinationsbehandlung mit Herb A und TRIKI ebenfalls bläschenartige Abschnürungen der Gastrodermis (D). Dieser Effekt verstärkte sich nach 6 Tagen der Behandlung (H), wodurch der komplette Darmtrakt mit abgeschnürter Gastrodermis gefüllt ist. Diese Effekte wurden häufiger in Würmern der Kombinationsbehandlung als bei Behandlung mit Herb A gefunden.

Langzeitbehandlungen mit den Inhibitoren Herb A allein, bzw. in Kombination mit TRIKI konnten zeigen, dass diese Inhibitoren zu morphologischen Veränderungen der Gastrodermis der Würmer führen. Dabei scheint Herb A einen stärkeren Einfluss auf die Struktur des Gewebes auszuüben als TRIKI.

### **3.1.4 Microarray-Experimente nach vorangegangener Inhibitorbehandlung adulter Schistosomenweibchen**

Obwohl die durchgeführten Inhibitorbehandlungen in dieser Arbeit zu teils nicht identischen physiologischen (reduzierte mitotische Aktivität und Eiproduktion) und morphologischen Veränderungen im Vergleich zu vorangegangenen Studien (Knobloch et al., 2007, Beckmann et al., 2010a) führten, wurde dennoch das Ziel verfolgt, den Einfluss der Inhibitoren auf das Transkriptom behandelter Weibchen zu untersuchen. Für diese Versuche wurden Schistosomenpaare wie in Kapitel 2.2.2.1 für 48 h mit DMSO als Kontrolle bzw. mit TRIKI (300 nM), Herb A (4,5  $\mu$ M) oder der Kombination beider Inhibitoren in der jeweiligen Konzentration behandelt. Anschließend wurden die Paare separiert, die RNA der Weibchen isoliert und diese für die Transkriptomuntersuchungen mittels Microarray-Analyse verwendet (vgl. Kapitel 2.2.14; Verjovski-Almeida et al., 2007). Die bei der Hybridisierung der Microarrays erhaltenen Fluoreszenzsignale wurden wie im Abschnitt 2.2.14.2 normalisiert, gefiltert und anschließend der Signifikanzanalyse unterzogen. Die erhaltenen Rohdaten nach

Prozessierung mit der *Feature Extraction Software* (Agilent Technologies) sind in der GEO (*gene expression omnibus*)-Datenbank unter der Studiennummer GSE39732 erhältlich.

Eines der Ziele dieser Microarray-Experimente war die vergleichende Analyse der identifizierten differentiell transkribierten Gene der drei Inhibitorbehandlungen, um eine mögliche Kooperation der inhibierten Signalwege bei der Transkriptionsregulation zu untersuchen. Da in jeweils einem Experiment der Microarrays mit RNA der Herb A-, bzw. Kombinationsbehandelter Würmer technische Probleme auftraten und diese Experimente eine geringe Gesamtkorrelation aufwiesen, wurden sie in den folgenden Signifikanzanalysen nicht berücksichtigt. Obwohl die Microarray-Analyse mit RNA TRIKI-behandelter Weibchen keine technischen Probleme aufwies, wurde dennoch zugunsten der Vergleichbarkeit mit den Microarray-Daten der anderen Inhibitorbehandlungen ein Experiment in der Signifikanzanalyse nicht verwendet. Dafür wurden die Totalintensitäten der Fluoreszenzsignale aller gefilterten Oligosonden dieser Experimente berechnet. Das Experiment TRIKI/DMSO 4 besaß dabei die geringste Totalintensität und wurde für die folgenden Auswertungen nicht weiter berücksichtigt. Ein weiteres Kriterium der Vergleichbarkeit dieser Daten ist die Wahl des Signifikanzniveaus, welches für alle drei Datensätze bei  $q \leq 0,03$  lag. Die Ergebnisse werden im Folgenden für alle Inhibitorbehandlungen separat dargestellt.

### **3.1.4.1 Identifizierung und erste Auswertung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung adulter Schistosomenweibchen mit TRIKI**

Für Microarrays nach der TRIKI-Behandlung konnten von den 8745 erhaltenen Fluoreszenzsignalen bei einem Signifikanzniveau von  $q \leq 0,03$  2595 als signifikant differentiell transkribierte Gene identifiziert werden (s. digitaler Anhang Tabelle 1). Von diesen wurden 2330 als proteinkodierende Gene identifiziert und 265 wiesen putative *antisense*-Orientierungen zu den annotierten proteinkodierenden Genen dieser Loci auf (Tabelle 3-1). Die detaillierte Auswertung der proteinkodierenden Gene ergab, dass rund dreimal so viele Gene eine verstärkte (1766) Transkription aufwiesen wie eine reduzierte (565). Für die putativen *antisense*-orientierten Gene wurde das entgegengesetzte Ergebnis ermittelt, d.h. von mehr Genen wurde die Transkription durch den Inhibitoreinfluss verringert (198 Gene) als erhöht (66 Gene). Alle weiteren Auswertungen der Daten wurden exklusiv nur für die proteinkodierenden Gene durchgeführt.

Tabelle 3-1: Einteilung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung mit TRIKI,  $q \leq 0,03$ 

Orientierung der Oligosonde	Gesamtzahl signifikant differentiell transkribierter Gene	Anzahl differentiell transkribierter Gene entsprechend der Regulationsrichtung	Regulationsrichtung der Transkriptionsmenge
sense	2330	565	reduziert
		1766	erhöht
antisense	145	198	reduziert
		67	erhöht

Die Vergleichbarkeit der Einzelerperimente nach dieser Inhibitorbehandlung wurde durch hierarchische Anordnungen überprüft (vgl. Anhang 5.1.2, A). Dabei wurden die technischen Replikate der unabhängigen biologischen Experimente TRIKI/DMSO 6 und 5 sowie TRIKI/DMSO 1 und 2 nebeneinander angeordnet. Dementsprechend ist für diese Experimente eine hohe Vergleichbarkeit nach den entsprechenden *dye swap*-Kontrollen gewährleistet. Das dritte biologische Replikat beinhaltete nur das Experiment TRIKI/DMSO 3, welches separat angeordnet wurde, aber dennoch eine ähnliche Transkriptionsregulation wie die anderen Experimente zeigte. Die separate Anordnung dieses Experiments kann durch eine stärkere Regulation einer Vielzahl an Genen, sichtbar durch die intensivere Färbung, erklärt werden.

Um einen Überblick über die identifizierten Gene mit differentieller Transkription zu erhalten, wurden diese mittels *Gene Ontology* (GO)- und *Ingenuity Pathway* (IPA)- Analysen untersucht (Ashburner et al., 2000; Thomas & Bochev, 2010). Durch diese Analysen sowie eine zusätzliche manuelle Einteilung von Genen sollte anschließend eine Auswahl an Genen getroffen werden, die mit Hilfe von qPCR-Analysen verifiziert wurden.

In der GO-Analyse wurden Kategorien der Ontologien „Biologischer Prozess“ und „Zelluläre Komponente“ für angereicherte Gene mit Transkriptionserhöhung oder –reduktion identifiziert (Korrektur nach Benjamini-Hochberg, BH;  $q \leq 0,05$ ; digitaler Anhang, Tabelle 2). Die Kategorie *ncRNA metabolic process* wurde für angereicherte Gene mit erhöhter Transkription in der Ontologie „Biologischer Prozess“ identifiziert. Bei verringerter Transkription nach TRIKI-Behandlung wurden angereicherte Gene in den Kategorien *mRNA metabolic process* (Ontologie: „Biologischer Prozess“), sowie *envelope* und *mitochondrion* (Ontologie: „Zelluläre Komponente“) detektiert.

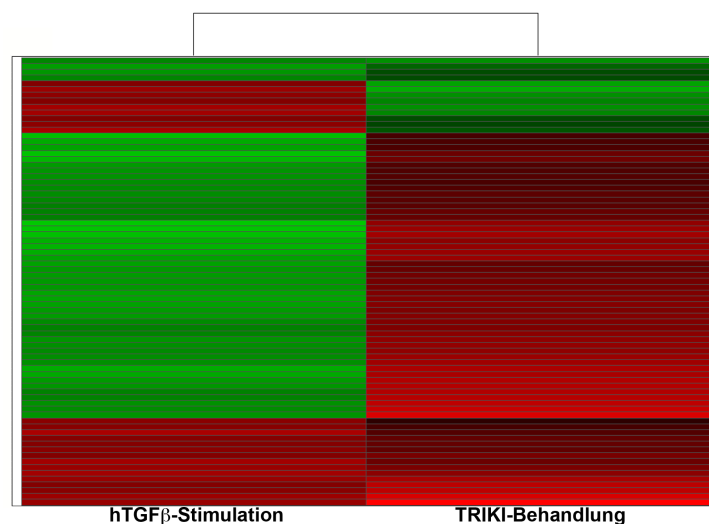
Neben der GO wurde eine IPA durchgeführt, wobei die fünf signifikantesten Netzwerke mit statistisch angereicherten Genen vorgestellt werden (vgl. digitaler Anhang Tabelle 3). Das erste Netzwerk enthält Gene, deren Proteine an Genexpression, Proteinsynthese und Aminosäuremetabolismus beteiligt sind. Angereicherte Gene des zweiten Netzwerks haben Funktionen in der Biochemie kleiner Moleküle, Lipidmetabolismus und Aminosäuremetabolismus. Im dritten Netzwerk wurden Moleküle identifiziert, die mit dem Zellzyklus, zellulären Funktionen und deren Aufrechterhaltung sowie molekularem

Transport assoziiert sind. Die angereicherten Gene des Netzwerks 4 sind notwendig für den Nukleinsäuremetabolismus, Biochemie kleiner Moleküle, DNA-Replikation, -Rekombination, -Reparatur. Das fünfte Netzwerk beinhaltet Gene, deren Proteine die mit dem Lipidmetabolismus, Nukleinsäuremetabolismus und der Biochemie kleiner Moleküle assoziiert sind.

### 3.1.4.1.1 Vergleich differentiell transkribierter Gene nach Behandlung mit TRIKI bzw. humanem TGF $\beta$

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden adulte Schistosomen mit 1 nM humanem TGF $\beta$  (hTGF $\beta$ ) stimuliert und anschließend für Microarray-Experimente verwendet (Oliveira et al., 2012). Die spezifische Bindung von hTGF $\beta$  durch SmT $\beta$ RI und anschließende Phosphorylierung von SmSmad2 wurde bereits beschrieben (Beall & Pearce, 2001). Die Stimulation adulter Schistosomen *in vitro* mit hTGF $\beta$  stellt das entgegengesetzte Experiment zur Inhibierung des Rezeptors durch TRIKI dar, wodurch eine konträre Regulation der Transkription von Genen erwartet wurde. Für beide Studien wurde die gleiche Microarray-Plattform verwendet, sodass ein Vergleich der differentiell transkribierten Gene einen wichtigen Aspekt für die Transkriptomanalyse dieser Arbeit darstellt.

Oliveira et al. (2012) identifizierte insgesamt 381 Gene als signifikant differentiell transkribiert, nach Stimulation mit hTGF $\beta$  bei den Kriterien eines  $\log_2$ Ratio-Werts  $\geq 1$  und  $q < 0,05$ . Von diesen Genen wurden 316 nach Stimulation transkriptionell verringert und 65 verstärkt. Im Vergleich dazu wurden bei der Behandlung mit TRIKI ( $q \leq 0,03$ ) 1766 protein-kodierende Gene transkriptionell verstärkt und 565 reduziert. Zusammenfassend wurden bei Stimulation des SmT $\beta$ RI mit hTGF $\beta$  mehr Gene transkriptionell verringert und bei der Inhibition durch Kultivierung mit TRIKI insgesamt mehr Gene transkriptionell erhöht.



**Abbildung 3-8: Vergleich der signifikant differentiell transkribierten Gene nach Stimulation mit hTGF $\beta$ , bzw. Inhibition mit TRIKI in Form einer hierarchischen Anordnung**

Als signifikant differentiell transkribiert nach Stimulation mit hTGF $\beta$ , bzw. Inhibition mit TRIKI wurde eine Schnittmenge von 77 Genen in beiden Microarray-Analysen detektiert. Von diesen wurden die Mittelwerte der log<sub>2</sub>Ratios miteinander verglichen und Gene mit verstärkter Transkription rot, bzw. mit verringerter Transkription grün dargestellt.

Die Untersuchung einer möglichen Schnittmenge an differentiell transkribierten Genen wurden mit Hilfe des Programms *Spotfire* anhand der Oligo-IDs der Gene erstellt (s. digitaler Anhang Tabelle 4). Diese Schnittmenge enthielt 77 Gene, von denen nach Behandlung mit TRIKI 13 Gene transkriptionell reduziert und 64 erhöht wurden (vgl. Abb. 3-8). Für die Transkriptomanalyse nach Stimulation mit hTGF $\beta$  wurden 58 dieser Gene und damit 75% der untersuchten Gene gegensätzlich reguliert, 19 Gene zeigten in beiden Analysen die gleiche Regulationsrichtung. Diese inverse Korrelation ( $r_s = -0,259$  nach Spearman) wurde aufgrund der entgegengesetzten Behandlung adulter Schistosomen erwartet. Bei detaillierter Untersuchung dieser Gene wurden 5 Oligosonden als putative *antisense*-Transkripte dieser Genloci identifiziert, über deren Regulationsrichtungen keine Aussagen getroffen werden kann. Die weiteren 14 Fluoreszenzsignale entsprechen proteinkodierenden Genen.

**3.1.4.2 Identifizierung und erste Auswertung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung adulter Schistosomenweibchen mit Herbimycin A**

Von insgesamt 8016 Fluoreszenzsignalen nach der Herb A-Behandlung wurden 1181 Gene als signifikant differentiell transkribiert bestimmt ( $q \leq 0,03$ ; vgl. digitaler Anhang, Tabelle 5). Wie auch nach Behandlung mit TRIKI wurden durch Herb A mehr proteinkodierende Gene transkriptionell erhöht (719) als in ihrer Transkription verringert (302; s. Tabelle 3-2). Dagegen zeigten putative *antisense*-orientierte Gene die entgegengesetzte Verteilung, d.h. 56 Gene wurden transkriptionell erhöht und etwa die doppelte Menge an Genen (104) transkriptionell verringert. Auch für diese Inhibitorbehandlung wurden weitere Auswertungen nur mit den proteinkodierenden Genen durchgeführt.

**Tabelle 3-2: Einteilung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Herbimycin A-Behandlung,  $q \leq 0,03$**

Orientierung der Oligosonde	Gesamtzahl signifikant differentiell transkribierter Gene	Anzahl differentiell transkribierter Gene entsprechend der Regulationsrichtung	Regulationsrichtung der Transkriptionsmenge
sense	1021	302	reduziert
		719	erhöht
antisense	160	103	reduziert
		57	erhöht

Die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente dieser Inhibitorbehandlung wurde durch hierarchische Anordnung überprüft (vgl. Anhang 5.1.2, B), wobei die technischen Replikate der biologischen Experimente Herb/DMSO 2 und 1 bzw. Herb/DMSO 5 und 6 nebeneinander angeordnet wurden. Im Vergleich dazu zeigte das dritte biologische Replikat Herb/DMSO 3 für viele Gene nur eine schwache Regulation (erkennbar an der schwarzen Färbung) und wurde entsprechend separat angeordnet. Ein Grund für diese Unterschiede könnten die Probleme beim Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe sein.

Die erste Unterteilung dieser Daten erfolgte mittels GO-Analyse und IPA. Diese Auswertungen wurden ebenfalls für die spätere Auswahl an Genen zur Validierung genutzt. In der GO-Analyse wurden Kategorien von angereicherten Genen mit erhöhter Transkription für alle drei Ontologien identifiziert (vgl. digitaler Anhang Tabelle 6; nach BH Korrektur und  $q \leq 0,05$ ). Dabei wurden die Kategorien *negative regulation of molecular function*, *cellular carbohydrate metabolic process*, *protein folding* und *glycoprotein metabolic process* für die Ontologie „Biologischer Prozess“ gefunden. Die Kategorien *peptidase regulator activity*, *enzyme inhibitor activity* und *peptidase inhibitor activity* wurden für die Ontologie „Molekulare Funktion“ ermittelt. Die Ontologie „Zelluläre Komponenten“ umfasste die Kategorien *nuclear membrane-endoplasmatic reticulum network* sowie *endoplasmatic reticulum membrane*.

Durch Anwendung der IPA konnten differentiell transkribierte Gene in Netzwerken angereichert werden, wobei die 5 signifikantesten Netzwerke vorgestellt werden (vgl. digitaler Anhang Tabelle 7). Das erste Netzwerk enthält angereicherte Gene, deren Proteine an der posttranslationalen Modifikation und Proteinfaltung sowie im humanen System an der Ausbildung von Tumoren beteiligt sind. Gene des zweiten Netzwerks sind assoziiert mit verschiedenen Krankheitsbildern des Menschen, speziell der Tumorbildung, gastrointestinalen Krankheiten und genetischen Fehlfunktionen. Im dritten Netzwerk wurden angereicherte Gene identifiziert, deren Proteine beteiligt sind an posttranskriptionaler RNA-Modifikation, DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur sowie Energieproduktion. Das vierte Netzwerk beinhaltet Gene mit Funktionen sowie Entwicklung endokriner Systeme, Biochemie kleiner Moleküle und zellulärer Funktion und Aufrechterhaltung. Im fünften Netzwerk wurden angereicherte Gene gefunden, deren Proteine Funktionen besitzen während des Kohlenstoffmetabolismus, der zellulären Aufrechterhaltung sowie des molekularen Transports. Als zusätzliche Anwendung der IPA wurde anhand differentieller Transkriptionsregulationen durch Sequenzvergleiche zum humanen System die Aktivität von Transkriptionsfaktoren bestimmt. Für die Herb A-Behandlung wurde dabei eine Inhibierung des Proteins p53 ermittelt. Herb A erhöht zwar die Expression von p53 (Yamaki et al., 1989), allerdings wird gleichzeitig die Phosphorylierung des Proteins verringert, wodurch die Aktivität des Proteins inhibiert wird (Takahashi et al., 1992).

### 3.1.4.3 Identifizierung und erste Auswertung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung adulter Schistosomenweibchen mit TRIKI und Herbimycin A

Von den 11668 Fluoreszenzsignalen der Kombinationsbehandlung mit TRIKI und Herb A (H+T), die den Filterungskriterien entsprachen, wurden 521 Gene als signifikant differentiell transkribiert bestimmt ( $q \leq 0,03$ ; s. digitaler Anhang Tabelle 8). Die insgesamt 411 proteinkodierende Gene (vgl. Tabelle 3-3) zeigten häufiger eine transkriptionelle Erhöhung (254 Gene) als eine Reduktion (157 Gene). Für diese Behandlung wurde für die 110 putativen *antisense*-Transkripte eine ähnliche Verteilung gefunden, wobei fast die doppelte Anzahl an Genen transkriptionell erhöht wurde (70) und nur 40 verringert.

**Tabelle 3-3: Einteilung signifikant differentiell transkribierter Gene nach kombinierter Behandlung mit TRIKI und Herbimycin A ,  $q \leq 0,03$**

Orientierung der Oligosonde	Gesamtzahl signifikant differentiell transkribierter Gene	Anzahl differentiell transkribierter Gene entsprechend der Regulationsrichtung	Regulationsrichtung der Transkriptionsmenge
<i>sense</i>	411	157	reduziert
		254	erhöht
<i>antisense</i>	110	40	reduziert
		70	erhöht

Eine hierarchische Anordnung der Microarray-Experimente nach kombinierter Behandlung mit TRIKI und Herb A (vgl. Anhang 5.1.2, C) zeigte eine hohe Vergleichbarkeit der technischen Replikate der zwei biologischen Replikate H+T/DMSO 6 und 5 bzw. H+T/DMSO 3 und 4. Das dritte Experiment H+T/DMSO 2 wurde als drittes biologisches Replikat separat angeordnet und zeigte für einige Gene eine schwache Regulation (schwarze Färbung). Als Erklärung für diese Unterschiede der Transkriptionsregulationen gelten wahrscheinlich Probleme beim Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe.

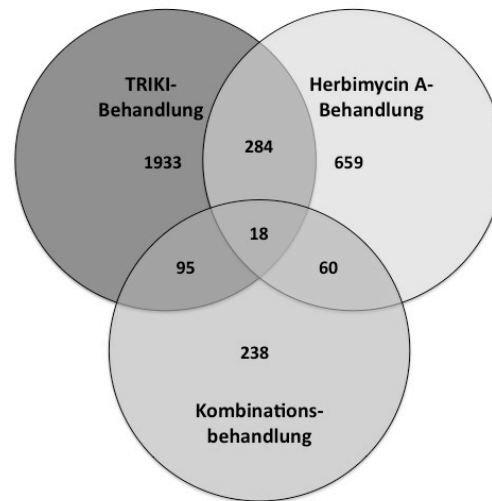
Um einen Überblick der differentiell transkribierten Gene nach kombinierter Behandlung mit TRIKI und Herb A zu erhalten, wurden GO-Analysen und eine IPA durchgeführt, deren Ergebnisse für die spätere Auswahl einiger Gene für Validierungsversuche genutzt wurden. In der GO-Analyse konnten in verschiedenen Kategorien aller drei Ontologien Gene angereichert werden, die eine erhöhte oder reduzierte Transkription aufwiesen (BH-Korrektur,  $q \leq 0,05$ ; vgl. digitaler Anhang, Tabelle 9). Die Ontologie „Biologischer Prozess“ beinhaltete für Gene mit verstärkter Transkription die Kategorien *multicellular organismal process*, *localisation of cell*, *nucleobase*, *nucleoside*, *nucleotide and nucleic acid transport*, *RNA localisation*, *metabolic process*, *regulation of cellular metabolic process*, *regulation of biosynthetic process* und *cellular nitrogen compound metabolic process*. Die Kategorien *hydrolase activity*, *acting on acid anhydrides*, *structural*

*molecule activity*, *binding* und *calmodulin binding* wurden für angereicherte Gene mit erhöhter Transkription der Ontologie „molekulare Funktion“ zugeordnet. Für die Ontologie „Zelluläre Komponente“ wurden angereicherte Gene mit transkriptioneller Erhöhung in den Kategorien *intracellular*, *organelle* und *macromolecular complex* gefunden. Viele Gene mit verringerter Transkription wurden in den Kategorien *membrane lipid biosynthetic process*, *protein modification process* und *melanin biosynthetic process* der Ontologie „Biologischer Prozess“ als signifikant angereichert detektiert. Die Kategorien *ion binding* und *peptidase activity* wurden für angereicherte Gene der Ontologie „Molekulare Funktion“ gefunden, sowie *membrane* und *nucleic acid metabolic process* für die „Zelluläre Komponente“. Mit der IPA wurden Netzwerkanalysen durchgeführt, wobei die zwei signifikantesten Netzwerke vorgestellt werden (vgl. digitaler Anhang, Tabelle 10). Das erste Netzwerk mit signifikant angereicherten Genen ist assoziiert mit posttranslationaler Modifikation und Proteinfaltung. Dem Netzwerk zwei wurden proteinkodierende Gene der zellulären Funktion und Erhaltung, Nukleinsäuremetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle zugeordnet. Als weitere Untersuchung der IPA wurden anhand angereicherter differentiell transkribierter Gene nach Transkriptionsfaktoren gesucht und myc als aktives Protein identifiziert. Yamada et al. (1996) zeigten einen Anstieg der Expression des Proteins in humaner K562-Zellkultur nach einer Behandlung mit Herb A für 6h, entsprechend ist die Aktivierung des Proteins in adulten Schistosomenweibchen bei einer Behandlungsdauer von 48 h ebenso möglich.

### **3.1.5 Vergleich der signifikant differentiell transkribierten Gene der einzelnen Inhibitorbehandlungen**

Eines der Ziele der Microarray-Analysen war der Vergleich differentiell transkribierter Gene der einzelnen Behandlungen, um Gene zu identifizieren, die von mehr als einem Inhibitor in ihrer Transkription reguliert werden. Dafür wurden die proteinkodierenden Gene mit Hilfe des Programms *Spotfire* anhand ihrer Oligo-IDs miteinander verglichen und die Schnittmengen ermittelt (Abb. 3-9; vgl. digitaler Anhang, Tabelle 11).





**Abbildung 3-9: Schnittmengendiagramm der differentiell transkribierten Gene ( $q \leq 0,03$ ) der verschiedenen Inhibitorbehandlungen**

Jeder Kreis entspricht einer Inhibitorbehandlung, d.h. TRIKI (anthrazit), Herbimycin A (hellgrau) oder Kombinationsbehandlung (dunkelgrau) und enthält die jeweilige Anzahl der differentiell transkribierten proteinkodierenden Gene ( $q \leq 0,03$ ).

Für jede Inhibitorbehandlung wurden Gene identifiziert, deren transkriptionelle Regulation durch mehr als einen Inhibitor beeinflusst wird (s. Abb. 3-9; Schnittmengen). Innerhalb der signifikant regulierten Gene der drei Inhibitorbehandlungen wurde jedoch die größte Anzahl an Genen ausschließlich durch den jeweiligen Inhibitor beeinflusst, d.h. in der TRIKI-Behandlung wurden 1933 Gene ausschließlich durch diesen Inhibitor in ihrer Transkription reguliert. Durch Behandlung mit Herb A wurden exklusiv 659 Gene transkriptionell beeinflusst. Bei Kombination beider Inhibitoren wurde die Transkription von 238 Genen reguliert.

Durch die Einzelbehandlungen mit TRIKI, bzw. Herb A wurden 302 Gene in ihrer Transkription beeinflusst, von denen 87% (d.h. 263) durch beide Inhibitoren in die gleiche Richtung reguliert werden. Von diesen 263 Genen zeigten 213 eine transkriptionelle Erhöhung und 50 eine reduzierte Transkription. 13% der Gene wurden gegensätzlich reguliert, d.h. die Transkription von 18 Genen wurde durch Verwendung von TRIKI erhöht und für 21 Gene verringert, bei Einsatz von Herb A wurde das entgegengesetzte Ergebnis ermittelt.

Für 113 Gene führte sowohl die Behandlung der Würmer mit TRIKI als auch die Kombinationsbehandlung (aus TRIKI und Herb A) zur Transkriptionsregulation. Davon wurden 32% in beiden Behandlungen gleich reguliert (Transkription von 34 Genen wurde erhöht und von 2 Genen verringert). Hingegen wurde die Transkription von 68% der Gene bei beiden Behandlungen unterschiedlich reguliert. Dabei wurde nach Behandlung mit TRIKI

die Transkriptmenge von 64 Genen erhöht und von 13 Genen verringert, bei Behandlung mit beiden Inhibitoren entsprechend entgegengesetzt.

Der Vergleich der differentiell transkribierten Gene nach Behandlung mit Herb A, bzw. Herb A in Kombination mit TRIKI, zeigte einen Einfluss auf insgesamt 78 Gene. Für diese Schnittmenge wurden mehr Gene (56 Gene, also 72%) in die gleiche Richtung reguliert als entgegengesetzt (22 Gene, d.h. 28%), wodurch hier eine konträre Regulation gefunden wurde als für den Überlappungsbereich der Behandlungen mit TRIKI, bzw. der Kombination beider Inhibitoren. Von den 56 Genen mit gleicher Regulationsrichtung wurden 46 transkriptionell erhöht und 10 verringert. Die 22 entgegengesetzt regulierten Genen beinhalteten 1 Gen mit erhöhter Transkription nach Herb A-Behandlung und 21 mit reduzierter Transkription (konträr reguliert nach Behandlung mit den kombinierten Inhibitoren).

Für 18 Gene wurde eine transkriptionelle Regulation durch alle drei Inhibitorbehandlungen festgestellt (vgl. Abb. 3-9). Zu diesen Genen gehören u. a. viele bislang nicht annotierte, hypothetische Proteine, ein Homolog des hsp70-interagierenden Proteins, ein Immunophilin und Calmodulin-4.

### **3.1.6 Validierung ausgewählter Gene mit inhibitorbehandlungsbedingter differentieller Transkription mittels quantitativen PCR**

Die im Microarray identifizierten Gene mit differentieller Transkription sollten mittels quantitativen PCRs (qPCR) validiert werden. Dafür wurde RNA von adulten Schistosomenweibchen verwendet, die zuvor einer zweitägigen Inhibitorbehandlung unterzogen wurden. Nach einer reversen Transkription der RNA wurde diese als 1:20 Verdünnung in die qPCR eingesetzt und die Transkriptmengen mittels absoluter Quantifizierung anhand einer Standardkurve aus verdünntem Amplifikationseluat bestimmt. Die Auswahl der Gene dieser Experimente erfolgte anhand identifizierter GO-Kategorien und Netzwerken der IPA, sowie einer manuellen Einteilung auf der Grundlage von Literaturhinweisen der Funktion bestimmter Gene. Für diese Validierungen wurden differentiell transkribierte Gene ( $q \leq 0,03$ ) aus allen Microarray-Analysen ausgewählt.

In den Microarray-Daten der Einzelbehandlungen mit TRIKI, bzw. Herb A, wurden viele Signalmoleküle identifiziert, darunter einige Mitglieder des schistosomalen TGF $\beta$ -Signalwegs (LoVerde et al., 2007). Als Vertreter der Rezeptoren dieses Signalwegs wurden der Typ I-Rezeptor SmT $\beta$ RI (Smp\_049760; Davies et al., 1998) und der Typ II-Rezeptor SmActivinRIIb (SmActRIIb; Smp\_144390) ausgewählt. Ein weiteres bekanntes Molekül des TGF $\beta$ -Signalwegs ist SmSmad4 (Smp\_033950; Osman, et al., 2004), welches als zelluläres Mitglied dieses Signalwegs ausgewählt wurde. Die Gene der Rezeptoren zeigten im Microarray nach

Behandlung mit TRIKI eine erhöhte Transkription, SmSmad4 wurde transkriptionell reduziert (vgl. digitaler Anhang, Tabelle 1). Bei Behandlung mit Herb A wurde der Rezeptor SmActRIIb ebenfalls in seiner Transkription erhöht im Gegensatz zu SmSmad4, welches als transkriptionell verringert identifiziert wurde (vgl. digitaler Anhang, Tabelle 5).

Im Zuge der manuellen Einteilung wurden verschiedene Gene identifiziert, deren Proteine an Prozessen der Eischalsynthese beteiligt sind. Die Validierung dieser Gene war von besonderem Interesse, da in ersten *in vitro* Experimenten eine reduzierte Eizahl ermittelt wurde (Knobloch et al., 2007), die Wiederholung dieser Experimente in dieser Arbeit jedoch zu keinen signifikanten Reduktionen führten (vgl. Kapitel 3.1.2). Bei den Genen der Validierungen wurden ein putatives *eggshell precursor protein* (Smp\_00430) und das Eischalvorläuferprotein p48 (Smp\_014610; Chen et al., 1992) ausgewählt, welches als Bestandteil der Eischale identifiziert wurde (deWalick et al., 2011). Zusätzlich wurde ein Protein mit Ähnlichkeit zum fs800 validiert. Bei dem Protein fs800 handelt es sich um ein weibchenspezifisches Protein (*female specific protein*), dessen Expression mit Einstellung der Eiproduktion stark verringert wird (Reis et al., 1989). Das hier ausgewählte fs800-ähnliche Protein (Smp\_000270) wurde wie p48 bereits als Bestandteil der Eischale identifiziert (deWalick et al., 2011). Als weiteres Gen dieser Einteilung sollte die Tyrosinase 1 (SmTYR1, Smp\_050270) auf Transkriptionsänderungen untersucht werden. Das Protein dieses Gens ist während der Eischalsynthese für die Vernetzung der Eischalvorläuferproteine notwendig (Fitzpatrick et al., 2007). Nach Behandlung mit TRIKI wurde eine transkriptionelle Erhöhung für das *eggshell precursor protein* und das fs800-ähnliche Protein im Microarray bestimmt. Im Vergleich zu diesen Genen wurden Reduktionen der Transkription von p48 nach Herb A-Behandlung, bzw. von dem fs800-ähnlichem Protein, *eggshell precursor protein* und SmTYR1 nach simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren in den entsprechenden Microarrays gefunden.

Bei der manuellen Einteilung wurden für alle drei Inhibitorbehandlungen verschiedene Oberflächenmoleküle identifiziert, von denen Tetraspanine für die Validierungsexperimente jedes Microarrays ausgewählt wurden. Dabei zeigte Tetraspanin 18 (Smp\_174190) nach der TRIKI-Behandlung unter den Tetraspaninen die stärkste Regulation, einhergehend mit der Transkriptionsreduktion. Für die Herb A-Behandlung sollte das Gen Tetraspanin-1 (Smp\_011560) in der qPCR untersucht werden, welches im Microarray ebenfalls als transkriptionell verringert identifiziert wurde. Das in der Kombinationsbehandlung ausgewählte Tetraspanin 1 (Smp\_155310.1) gehörte auch zu den Genen mit verringerter Transkription und war eines der angereicherten Gene der GO-Kategorie *membrane*.

Neben Src-Tyrosinkinasen wurde in Zellkulturexperimenten Hsp90 als ein weiteres Zielmolekül des Inhibitors Herb A beschrieben (Blagosklonny, 2002) und reguliert über

Hsp90 die Transkription anderer Hsp-Moleküle (Kasai & Kikuchi, 2010; Dinh et al., 2002). Bei der manuellen Einteilung der Microarray-Daten nach Herb A-, bzw. Kombinationsbehandlung, wurden transkriptionelle Änderungen vieler Hsp-Gene identifiziert. Durch Auswertung der IPA beider Behandlungen wurde Hsp70 jeweils als Vertreter des Netzwerks 1 identifiziert, wobei Gene dieser Netzwerke in beiden Fällen mit Funktionen der posttranslationalen Modifikationen und Proteinfaltungen assoziiert wurden. Für das Hsp70-Gen (Smp\_106930) wurde eine Transkriptionserhöhung in den jeweiligen Microarray-Daten bestimmt.

Als Gen mit transkriptioneller Regulation durch alle drei Inhibitorbehandlungen wurde Calmodulin-4 (Smp\_032990) ausgewählt. Zusätzlich gehört Calmodulin-4 zu den angereicherten Genen der GO-Kategorie *binding* der kombinierten Behandlung mit TRIKI und Herb A. Das Gen zeigte eine Reduktion der Transkription nach TRIKI-Behandlung, sowie eine transkriptionelle Erhöhung nach Behandlung mit Herb A, bzw. Kombination beider Inhibitoren.

Zu den weiteren ausgewählten Genen dieser Validierungsexperimente zählten die Natrium/Kalium-Pumpe (Na/K-Pumpe, Smp\_015020) und Cathepsin S (Smp\_139240). Das Netzwerk 3 der IPA beinhaltet das Natrium/Kalium-Pumpen-Gen und deutete auf eine Funktion dieses Gens während des Zellzyklus, zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung, bzw. molekularen Transport. Zur GO-Kategorie *peptidase activity* gehört das Gen von Cathepsin S, welches zusätzlich für Schistosomen als darmassoziiert identifiziert wurde (Nawaratna et al., 2011). Diese beiden Gene wurden im Microarray nach Behandlung mit TRIKI als transkriptionell erhöht identifiziert, das Cathepsin S-Gen zeigte zusätzlich eine reduzierte Transkription nach simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren.

### **3.1.6.1 qPCR-Experimente zur Verifizierung der Microarray-Daten von differentieller Transkription, ausgelöst durch TRIKI-Behandlung**

Für die Verifizierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse nach Behandlung mit TRIKI wurden die Gene von SmTβRI, SmActRIIb, fs800, *eggshell precursor protein*, Cathepsin S und Na/K-Pumpe für eine erhöhte Transkription ausgesucht (s. Abb. 3-10 A). Als Beispiele einer reduzierten Transkription nach Behandlung mit TRIKI wurden die Gene des Calmodulin-4, Tetraspanin 18 und SmSmad4 gewählt (vgl. Abb. 3-10 B).

Die Transkriptionsregulationen der Gene fs800, *eggshell precursor protein*, Calmodulin-4, Tetraspanin 18 und SmSmad4 zeigten tendenziell das gleiche Ergebnis in der qPCR wie zuvor im Microarray ermittelt. Trotz gleicher transkriptioneller Regulation der Gene der Rezeptoren SmTβRI, SmActRIIb im Microarray unterlag die Transkription dieser Gene in der qPCR starken Schwankungen der einzelnen biologischen Experimente. Diese

Schwankungen könnten ein Zeichen von biologischer Varianz verwendeter Wurmgruppen sein. Ein konträres Ergebnis beider Methoden wurde für die Transkription des Gens der Na/K-Pumpe gefunden. Die Microarray-Werte zeigen jedoch sehr hohe Standardabweichungen, wodurch die Möglichkeit besteht, dass dieses Gen zu den statistisch berechneten falsch-positiven Genen der Signifikanzanalyse des Microarrays gehört.

Im Vergleich der Ergebnisse der qPCR und Microarray-Analyse nach Behandlung mit TRIKI konnte keine signifikante Korrelation nach Spearman ermittelt werden ( $r_s \geq 0,135$ ).

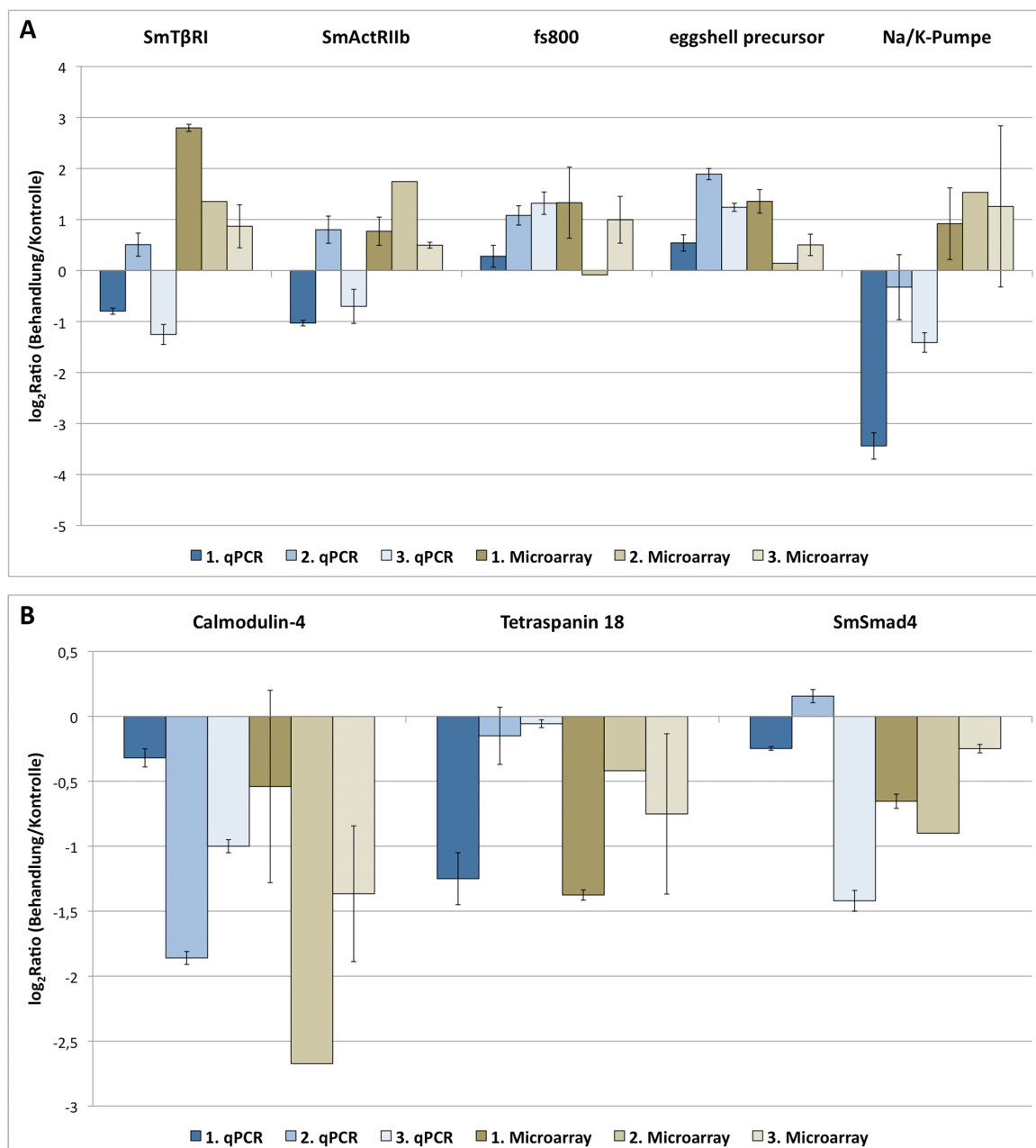


Abbildung 3-10: qPCR und Microarray-Resultate ausgewählter Gene zur Verifizierung der differentiellen Transkription nach TRIKI-Behandlung

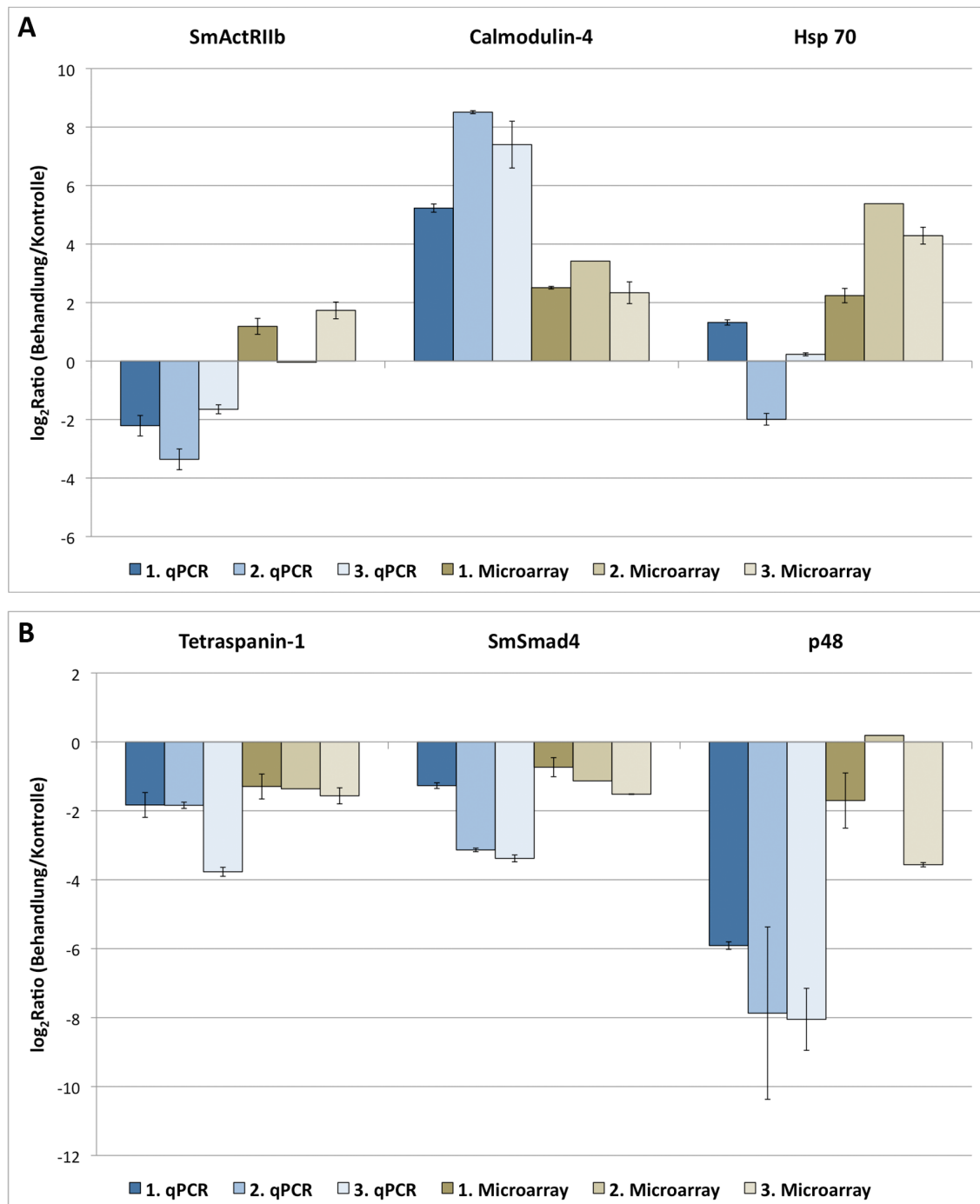
A: Repräsentativ ausgewählte Gene mit einer erhöhten Transkriptionsrate im Microarray waren SmTβRI, SmActRIIb, fs800, *eggshell precursor protein* und Na/K-Pumpe. B: Gene mit einer verringerten Transkription in der Microarray-Analyse entsprachen Calmodulin-4, Tetraspanin 18 und SmSmad4. Für qPCR und Microarray wurden jeweils 3 unabhängige biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten durchgeführt (Ausnahme ist der 2. Microarray). Die Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen der technischen Replikate sind dargestellt. Die ermittelten Transkriptionsunterschiede sind jeweils als  $\log_2$ Ratio (Behandlung/Kontrolle) angegeben. Die unterschiedlichen Blaufärbungen entsprechen den qPCR-Replikaten (1-3), die verschiedene Braunfärbungen den Microarray-Replikaten (1-3).

### **3.1.6.2 qPCR-Experimente zur Verifizierung der Microarray-Daten von differentieller Transkription, ausgelöst durch Herbimycin A-Behandlung**

Für diese Experimente wurden repräsentativ die Gene SmActRIIb, Calmodulin-4 und Hsp70 mit erhöhter Transkriptionsrate nach Behandlung mit Herb A ausgewählt (vgl. Abb. 3-11 A). Für die Überprüfung einer reduzierten Transkription durch diese Inhibitorbehandlung wurden die Gene der Moleküle Tetraspanin-1, SmSmad4 und p48 exemplarisch ausgesucht (s. Abb. 3-11 B).

Im Vergleich der detektierten Transkriptionsänderungen der qPCR und Microarray-Analysen zeigten tendenziell die Gene der Moleküle Calmodulin-4, Hsp70, Tetraspanin-1, SmSmad4 und p48 die gleiche Regulation. Die Transkription des SmActRIIb wurde in beiden Methoden mit entgegengesetzten Ergebnissen bestimmt. Aufgrund der geringen Standardabweichungen der Replikate wurden diese als zulässig eingestuft. Die ermittelte Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte erneut durch biologische Varianz der verwendeten Wurmgruppen der Experimente zu erklären sein.

Die Transkriptionsänderungen der qPCR- und Microarray-Analysen nach Inhibitorbehandlung mit Herb A zeigten im Vergleich eine signifikante Korrelation nach Spearman ( $r_s \geq 0,7234$ ).



**Abbildung 3-11: qPCR und Microarray-Resultate ausgewählter Gene zur Verifizierung der differentiellen Transkription nach Herbimycin A-Behandlung**

A: Repräsentativ ausgewählte Gene mit einer erhöhten Transkriptionsrate im Microarray waren SmActRIIb, Calmodulin-4 und Hsp70. B: Gene mit einer verringerten Transkription in der Microarray-Analyse entsprachen Tetraspanin-1, SmSmad4 und p48. Für qPCR und Microarray wurden jeweils 3 unabhängige biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten durchgeführt (Ausnahme ist der 2. Microarray). Die Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen der technischen Replikate sind dargestellt. Die ermittelten Transkriptionsunterschiede sind jeweils als log<sub>2</sub>Ratio (Behandlung/Kontrolle) angegeben. Die unterschiedlichen Blaufärbungen entsprechen den qPCR-Replikaten (1-3), die verschiedene Braunfärbungen den Microarray-Replikaten (1-3).

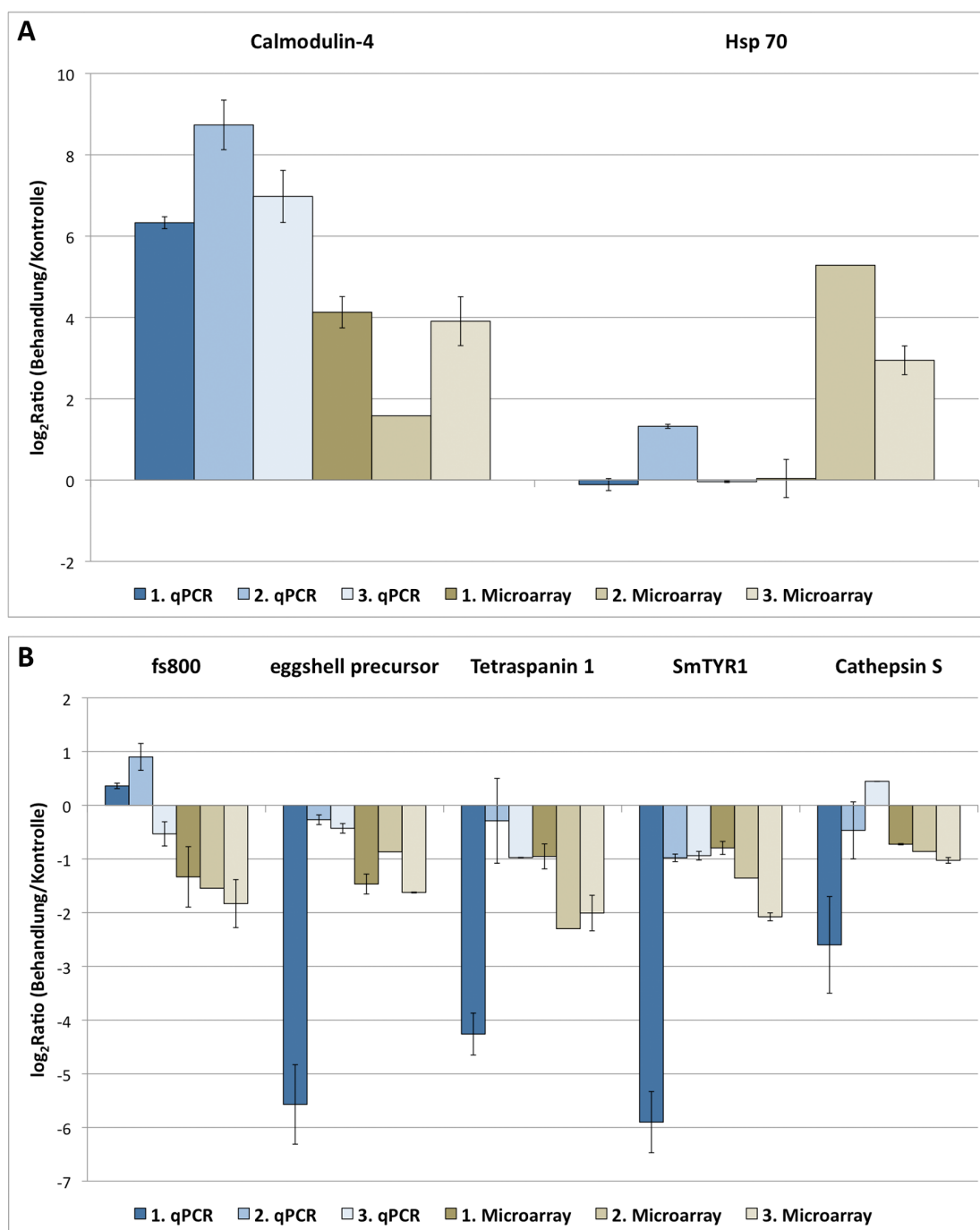
### **3.1.6.3 qPCR-Experimente zur Verifizierung der Microarray-Daten von differentieller Transkription, ausgelöst durch simultane TRIKI- und Herbimycin A-Behandlung**

Durch kombinierte Behandlung mit TRIKI und Herb A wurde eine erhöhte Transkriptionsrate für die repräsentativ ausgewählten Gene Calmodulin-4 und Hsp 70 in der Microarray-Analyse ermittelt (vgl. Abb. 3-12 A). Für Gene mit verringerter Transkription nach Kombinationsbehandlung wurden die Moleküle fs800, *eggshell precursor protein*, Tetraspanin 1, Tyrosinase 1 (SmTYR1) und Cathepsin S für diese Verifizierungsexperimente ausgewählt (s. Abb. 3-12 B).

Die Regulationstendenzen der Transkription der Microarray-Analyse konnte mit Hilfe der qPCR für die Gene Calmodulin-4, *eggshell precursor protein*, Tetraspanin 1, SmTYR1 und Cathepsin S bestätigt werden. Das Gen des Hsp 70-Homologs zeigte zumindest für ein biologisches Replikat der qPCR eine Erhöhung der Transkription. In der qPCR für das fs800-ähnliche Gen wurde in zwei biologischen Replikaten eine erhöhte Transkription ermittelt und nur ein Replikat der qPCR bestätigte die transkriptionelle Reduktion des Microarrays. Diese Ergebnisse könnten ebenfalls durch eine hohe biologische Varianz der verwendeten Parasiten für die Transkriptionsrate dieses Gens zustande kommen.

Auch die qPCR und Microarray Ergebnisse der Kombinationsbehandlung wurden miteinander verglichen und eine signifikante Korrelation nach Spearman bestimmt ( $r_s \geq 0,464$ ).



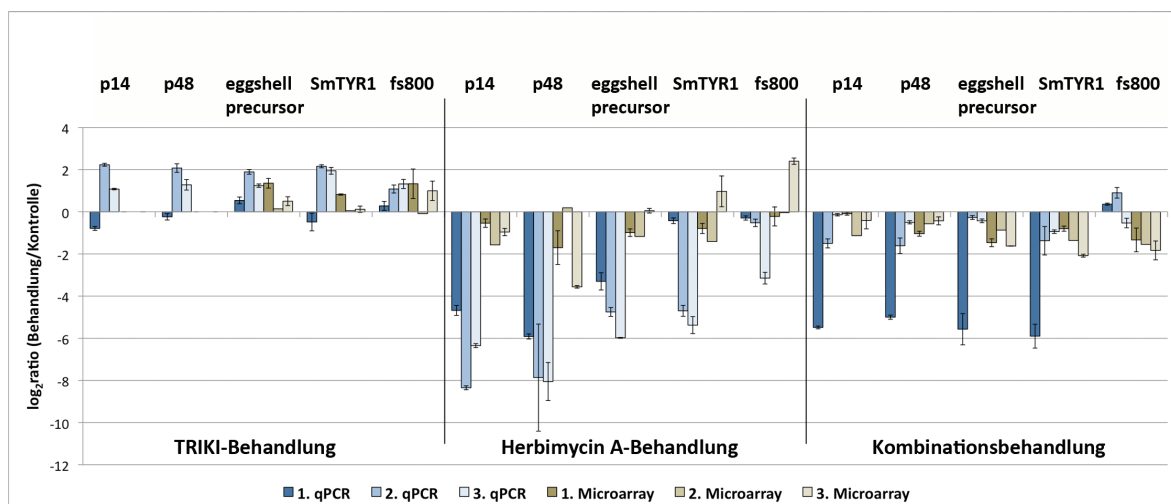


**Abbildung 3-12: qPCR und Microarray-Resultate ausgewählter Gene zur Verifizierung der differentiellen Transkription nach kombiniert TRIKI und Herbimycin A-Behandlung**

A: Repräsentativ ausgewählte Gene mit einer erhöhten Transkriptionsrate im Microarray waren Calmodulin-4 und Hsp70. B: Gene mit einer verringerten Transkription in der Microarray-Analyse entsprachen fs800, *eggshell precursor protein*, Tetraspanin 1, SmTYR1 und Cathepsin S. Für qPCR und Microarray wurden jeweils 3 unabhängige biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten durchgeführt (Ausnahme ist der 2. Microarray). Die Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen der technischen Replikate sind dargestellt. Die ermittelten Transkriptionsunterschiede sind jeweils als log<sub>2</sub>Ratio (Behandlung/Kontrolle) angegeben. Die unterschiedlichen Blaufärbungen entsprechen den qPCR-Replikaten (1-3), die verschiedene Braunfärbungen den Microarray-Replikaten (1-3).

## 3.1.6.4 Transkriptionsanalyse verschiedener Gene der Eischalsynthese nach vorangegangenen Inhibitorbehandlungen

Die ersten *in vitro* Experimente mit den Inhibitoren TRIKI und Herb A führten zu einer dosierungsabhängigen Reduktion der Oviposition adulter Schistosomen (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007). Im Vergleich zu diesen Daten konnten in den Experimenten der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede der Eiproduktion bei Inhibitor- oder kontrollbehandelten Würmern festgestellt werden (vgl. Kapitel 3.1.2). In den Daten der Microarray-Analyse wurden verschiedene proteinkodierende Gene mit (putativer) Funktion in Prozessen der Eischalsynthese als differentiell transkribiert bestimmt. Die für die jeweilige Inhibitorbehandlung signifikant regulierten Gene der Eischalsynthese wurden mit Hilfe von qPCR-Experimenten validiert (vgl. Kapitel 3.1.6.1; 3.1.6.2; 3.1.6.3). Um einen größeren Überblick über die Transkriptionsregulation von Genen der Eischalsynthese zu erhalten, wurden diese Validierungsexperimente erweitert. Mit Hilfe zusätzlicher qPCRs wurde für die drei Inhibitorbehandlungen die Transkription der (putativen) Eischalvorläufergene p14 (Smp\_131110.x; Köster et al., 1988), p48 und des *eggshell precursor proteins* bestimmt. Bei dem Protein von p14 handelt es sich um den Hauptbestandteil der Eischale (deWalick et al., 2011), dessen Gen besitzt die stärkste Transkription bei den Schistosomen (Chen et al., 1992; Kunz et al., 1995). Weiterhin wurde die Transkription des fs800 und der SmTYR1 nach den drei Inhibitorbehandlungen untersucht. Die Transkriptionsänderungen dieser Gene wurden sowohl in der qPCR als auch im Microarray bestimmt, wobei die Signifikanz der Microarray-Werte vernachlässigt wurde (vgl. Abb. 3-13).



**Abbildung 3-13: Übersicht repräsentativer differentiell transkribierter Gene der Eischalsynthese nach vorangegangenen Inhibitorbehandlungen**

Transkriptionsuntersuchung der Gene p14, p48, *eggshell precursor protein*, Tyrosinase 1 (SmTYR1) und fs800-ähnlich. Für qPCR und Microarray wurden jeweils 3 unabhängige biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten durchgeführt (Ausnahme ist der 2. Microarray). Die Mittelwerte und entsprechende

Standardabweichungen der technischen Replikate sind dargestellt. Die ermittelten Transkriptionsunterschiede sind jeweils als  $\log_2\text{Ratio}$  (Behandlung/Kontrolle) angegeben. Die unterschiedlichen Blaufärbungen entsprechen den qPCR-Replikaten (1-3), die verschiedenen Braunfärbungen den Microarray-Replikaten (1-3).

Durch die Behandlung mit TRIKI wurde für die untersuchten Gene in der qPCR eine erhöhte Transkription bestimmt (Ausnahme die 1. Replikate der Gene p14, p48 und SmTYR1). Aufgrund der Prozessierung der Microarray-Daten wurden durch die gewählten Filterkriterien keine Werte für die Gene p14 und p48 gefunden. Eine erhöhte Transkription im Microarray zeigten die Gene des *eggshell precursor proteins*, des fs800-ähnlichen Proteins und der SmTYR1, wobei diese Transkriptionsregulationen nur für die ersten beiden Gene als signifikant gelten.

Bei der Transkriptionsanalyse der ausgewählten Gene nach Behandlung mit Herb A wurde jeweils eine Verringerung der Transkription in der qPCR festgestellt. Der Großteil der Microarray-Ergebnisse bestätigte diese Tendenz für die ausgewählten Gene. Die jeweils dritten biologischen Experimente der Microarrays zeigten eine Erhöhung des Transkriptionslevels beim *eggshell precursor protein*, dem fs800-ähnlichen und der SmTYR1, sowie das zweite Replikat des p48. Obwohl das zweite Replikat eine konträre Regulationstendenz zeigte als die anderen Microarray-Experimente, wurde die Transkription von p48 als signifikant eingestuft.

Wie auch die Herb A-Behandlung, resultierte die Kombination beider Inhibitoren in einer reduzierten Transkription der untersuchten Gene. Diese Reduktion wurde sowohl in der qPCR als auch der Microarray-Analyse detektiert. Als einzige Ausnahmen zeigten die ersten zwei biologischen Replikate der qPCR eine Erhöhung der Transkription des fs800-ähnlichen Gens. Im Vergleich der Regulationsstärken waren die Transkriptionsreduktionen der Kombinationsbehandlung schwächer als bei denen der Herb A-Einzelbehandlung.

Zusammenfassend bewiesen diese Experimente einen Einfluss der Inhibitoren (TRIKI, Herb A, bzw. der Kombination beider Inhibitoren) auf die Transkription der untersuchten Gene der Eischalsynthese. Zusätzlich deuteten die ermittelten Regulationsstärken auf ein Zusammenwirken der Inhibitoren TRIKI und Herb A hin, da für die Kombinationsbehandlung eine Regulationsstärke als eine Art Mittelwert der Einzelbehandlungen identifiziert wurde.

### 3.2 Charakterisierung gonadenspezifisch exprimierter Gene

Neben der funktionellen Analyse der Src-Kinase SmTK3 lag im Weiteren der Fokus dieser Arbeit auf der Identifizierung von Signalwegen, an denen dieses Molekül beteiligt ist. Durch *in vitro* Verwendung des Src-Kinaseninhibitors Herbimycin A (Herb A) wurden unter anderem verschiedene Gene der Eischalsynthese in ihren Transkriptionen verändert (vgl. Kapitel 3.1.6.4). Um Hinweise auf weitere putative Funktionen von SmTK3 zu erhalten, war die Untersuchung von Signalwegen dieses Moleküls von besonderem Interesse. In diesem Zusammenhang identifizierten Quack et al. (2009) putative *downstream* Protein-Protein-Interaktionspartner mit Hilfe eines Y3H-Screenings. Nach qualitativer und quantitativer Analyse der Bindungspartner von SmTK3 wurde die stärkste Interaktion mit einem Homolog der BAF60-Untereinheit des Chromatin-Remodellierungskomplexes SWI/SNF (Mohrmann & Verrijzer, 2005) und als häufigster Interaktionspartner ein Protein mit Ähnlichkeit zu Diaphanous-Molekülen (SmDia) der Formin-Proteinfamilie identifiziert. Weitere Interaktionsstudien des letzteren Moleküls zeigten eine Bindung der GTPase SmRho1 (Vermeire et al., 2003), womit dieses Forminmolekül wahrscheinlich die Schnittstelle zweier Signalwege darstellt, von denen einer die Src-Kinase SmTK3 beinhaltet (Quack et al., 2009). Ein Charakteristikum von Forminen wie Diaphanous ist deren Beteiligung an der Organisation des Cytoskeletts (Young & Copeland, 2010). Aufgrund dieser Eigenschaft von Diaphanousproteinen postulierten Quack et al. (2009) für den Signalweg von SmTK3 und SmDia eine Beteiligung an diesen Prozessen in den Reproduktionsorganen adulter Schistosomen.

In weiteren Y3H-Ansätzen wurden Hinweise auf einen trimeren Kinasekomplex gefunden, welcher aus der Syk-Tyrosinkinase (TK) SmTK4, der Src-TK SmTK3 und der Src-/Abl-TK SmTK6 besteht. Dabei stellen SmTK3 und SmTK6 putative *upstream* Interaktionspartner von SmTK4 dar (Beckmann et al., 2010b). Durch Co-Immunopräzipitationen wurden die Interaktionen von SmTK4 und SmTK6 sowie SmTK3 und SmTK6 verifiziert (Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2011). Die Transkription dieser drei TKs findet, den Ergebnissen von *in situ*-Hybridisierungen zufolge, u.a. in den Reproduktionsorganen adulter Schistosomen statt (SmTK4 und SmTK6 in Ovar und Testes, SmTK3 in Ovar, Vitellarium und Testes), wodurch diese Moleküle im Ovar kolokalisieren (Knobloch et al., 2002a; Beckmann et al., 2010b; Kapp et al., 2004).

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung weiterer Protein-Protein-Interaktionspartner der Tyrosinkinasen SmTK3 und SmTK6.

### 3.2.1 Identifizierung von *upstream* Interaktionspartnern der Src-Kinase SmTK3

Um putative *upstream* Bindungspartner von SmTK3 zu identifizieren, wurde ein Y3H-Screening von Dr. Cora Burmeister (Institut für Parasitologie, AG Grevelding, Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt (Buro et al., in Vorbereitung). In diesem Screening einer Y2H-cDNA-Bank diente die Src Homologie 2 (SH2)-Domäne der Kinase als *bait*-Protein. Diese Domäne ist für die Bindung der Src-TK an phosphorylierte Tyrosinreste anderer Moleküle notwendig und vermittelt dadurch eine *upstream* Protein-Protein-Interaktion (Thomas & Brugge 1997; Boggon & Eck, 2004). Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass Hefen keine eigene Tyrosinkinaseaktivität besitzen (Ptacek et al., 2005), die heterologe Expression von TK-Domänen jedoch möglich ist. Aus diesem Grund wurde die TK-Domäne der Src-Kinase SmTK5 mit dem *bait*-Protein co-exprimiert (SmTK5TK; Smp\_136300; *Accession* Nr. AF232691; Kapp et al., 2001). Als Ergebnis dieses Y3H-Screenings wurde ein zum *Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8* ähnliches Protein (SmEps8; *Accession* Nummern: XM\_002574601 und CCD60001, Smp\_139520) als häufigster und zugleich stärkster Interaktionspartner der SmTK3SH2 identifiziert (Buro et al., in Vorbereitung). Weitere Bindungspartner der SH2-Domäne von SmTK3 waren ein *Heat shock protein 60* (Hsp60; *Accession* Nummer: CCD59264.1, Smp\_008545), ein Collagen (*Accession* Nummer: XP\_002581297.1, Smp\_135560) und das Protein des Eischalvorläufers p48 (AAA29908.1; Smp\_014610; Chen et al., 1992). Die anschließende Quantifizierung der relativen Bindungsstärken von SmTK3SH2 (+ SmTK5TK) führte im Vergleich zur starken Bindung mit SmEps8 zur Einstufung als vernachlässigbar geringe Interaktionen mit Hsp60, Collagen und p48 (Daten nicht gezeigt), weshalb die Charakterisierung von SmEps8 im Vordergrund weiterer Untersuchungen stand (Buro et al., in Vorbereitung).

#### 3.2.1.1 Charakterisierung des EGFR pathway substrate 8-Proteins (SmEps8)

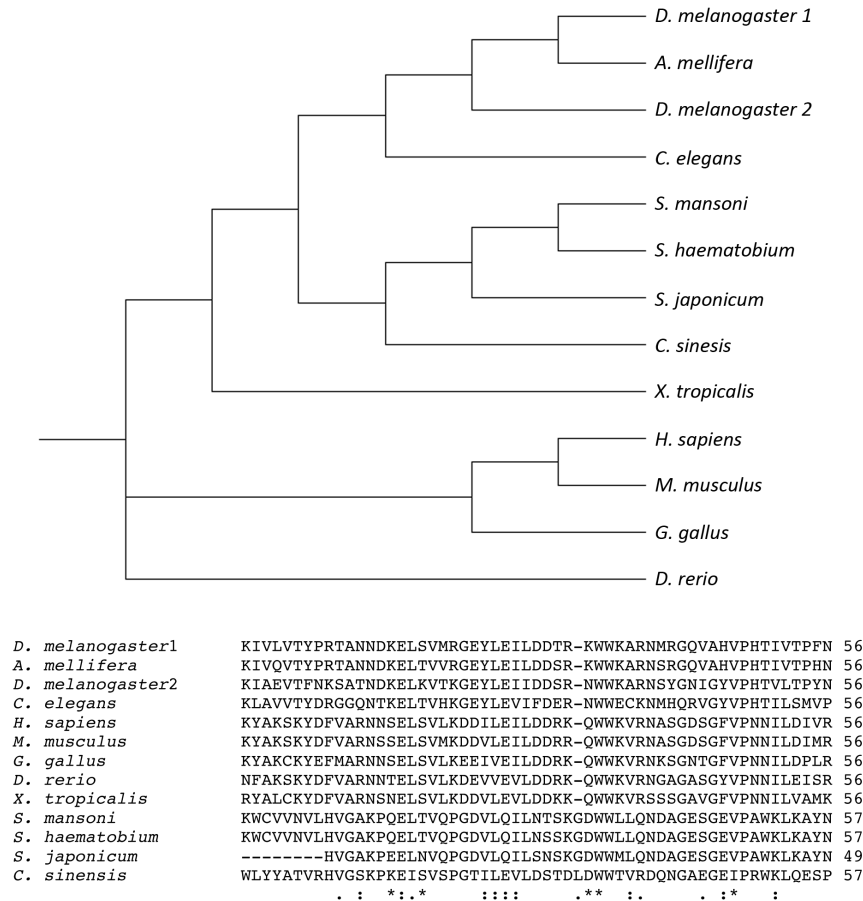
Bei den stärksten Interaktionspartnern von SmTK3SH2 + SmTK5TK handelte es sich um Eps8-ähnliche Proteine, die aufgrund unterschiedlicher Größen in zwei Gruppen untergliedert wurden. Zum einen handelte es sich um Vollklänge (2376 bp), zum anderen um C-terminal verkürzte Varianten (756 bp). Durch Untersuchungen der Nukleinsäuresequenzen wurde für beide SmEps8-Varianten eine putative 5'-UTR unmittelbar vor dem Startcodon identifiziert (vgl. Anhang 5.2.1). Daneben beinhalteten die Vollklänge eine putative 3'-UTR und einen Poly (A)-Bereich. Für Strukturanalysen wurden die Nukleinsäuresequenzen beider SmEps8-Varianten *in silico* in Aminosäuren (AS) umgeschrieben und mit Hilfe des Strukturvorhersageprogramms SMART (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2012) untersucht. Die Vollklänge besaßen eine Größe von 792 AS (vgl. Abb. 3-15, *Prey*-Sequenz), die verkürzten Varianten eine Größe von 252 AS. Mit Hilfe dieser Strukturanalyse konnte auch der für Eps8-Moleküle beschriebene typische Aufbau für

die Volllängenkclone von SmEps8 identifiziert gefunden werden (Di Fiore & Scita, 2002). So wurden am N-Terminus eine Phosphotyrosinbindedomäne (PTB, 8-151 AS, vgl. Abb. 3-15; hellgrau) und eine EGFR-Bindedomäne (EGFR-BD, 300-356 AS, vgl. Abb. 3-15 dunkelgrau) identifiziert. Der C-Terminus enthielt eine Eps8-spezifische SH3-Domäne (437-493 AS, vgl. Abb. 3-15 beige) sowie eine *steril alpha motif-pointed* Effektordomäne (SAM-PNT, 718-790 AS, vgl. Abb. 3-15 anthrazit). Die PTB-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen (Hubbard & Till, 2000), wobei ihr Bindemotiv aus den Aminosäuren NPxY besteht und der Tyrosinrest (Y) phosphoryliert vorliegt (x entspricht jeder beliebigen Aminosäure; Forman-Kay & Pawson, 1999). Die namensgebende Bindung von Eps8 an EGFRs erfolgt über die EGFR-BD (Castagnino et al., 1995). Durch die Eps8-spezifische SH3-Domäne kommt es zur Dimerisierung zweier SH3-Domänen von Eps8-Molekülen (Kishan et al., 1997). Zusätzlich erfolgen Interaktionen mit z.B. dem *Abelson interactor-1* (Abi-1) (Biesova et al., 1997) und RN-tre (Matòsková et al., 1996) über die SH3-Domäne. Die Effektordomäne SAM-PNT ist eine Subfamilie der SAM-Domänen und vermittelt Homo- oder Hetero-Oligomerisierungen (Di Fiore & Scita, 2002). Zusätzlich erfolgt die Bindung von Eps8 an F-Actin über die SAM-PNT Effektordomäne und bewirkt damit die zelluläre Lokalisierung des Moleküls (Scita et al., 2001). Stetak et al. (2006) definierte zusätzlich für das Eps8-Molekül von *Caenorhabditis elegans* (Accession Nummer: CAJ44244) eine Bindedomäne der LIN2-Kinase im Bereich der AS 462-511. Um diese Bindedomäne im SmEps8 zu identifizieren, wurde ein Alignment der AS-Sequenzen von *S. mansoni* und *C. elegans* durchgeführt (vgl. Anhang 5.2.2), wobei im Bereich der AS-Position 513-558 drei identische und mehrere ähnliche AS identifiziert und so eine Übereinstimmung von 32% ermittelt wurde.

Bei den C-terminal verkürzten SmEps8-Klonen wurden ebenfalls die PTB-Domäne sowie ein kurzer Abschnitt von ca. 100 AS zwischen der PTB und EGFR-BD identifiziert (vgl. 5.2.1). Die Verkürzung des kodierenden Leserahmens dieser SmEps8-Klone kann durch eine mögliche Fehlpaarung des Oligo d(T)-Primers bei der Synthese der cDNA-Bank erklärt werden. Da zwischen der PTB und der EGFR-BD ein adeninreicher Bereich existierte, war eine Bindung des Oligo d(T)-Primers an diesen vermeintlichen Poly (A)-Bereich möglich.

Im Zuge der strukturellen Analyse des SmEps8-Moleküls fielen unterschiedliche Lokalisierungen der einzelnen Domänen im Vergleich zu Eps8-Proteinen anderer Spezies auf. Aus diesem Grund wurde ein Multialignment für diese Proteine mit denen von *H. sapiens* (Accession Nummer: Q12929), *Mus musculus* (Accession Nummer: AAA16358), *Gallus gallus* (Accession Nummer: XP\_416405), *Xenopus tropicalis* (Accession Nummer: NP\_0010702508), *Danio rerio* (Accession Nummer: NP\_956536), *Drosophila melanogaster* (Accession Nummern: 1: AAF21013 und 2: AAL13963), *Apis mellifera* (Accession Nummer: XP\_392229), *Clonorchis sinensis* (Accession Nummer: GAA35243) und *C. elegans* (Accession Nummer: CAJ44244) durchgeführt (vgl. Anhang 5.2.2). Wie erwartet, wurden nur geringe Übereinstimmungen von SmEps8 zu Eps8-Molekülen anderer Organismen gefunden (12%

Identität zu Eps8 von *C. elegans* und 13% Identität zu Eps8 von *H. sapiens*, *G. gallus*, *X. tropicalis* und dem Homolog mit der *Accession* Nummer AAF21013 aus *D. melanogaster*, sowie 14% Identität zu den Eps8-Molekülen aus *M. musculus* und *D. rerio*). Eine höhere Übereinstimmung der Sequenzen zeigten das zweite Eps8-Molekül aus *D. melanogaster* (AAL13963; 15% Identität), Eps8 von *A. mellifera* (16%) und von *C. sinensis* (32%). Zusammenfassend wurde in diesem Alignment eine geringe Übereinstimmung von SmEps8 zu den Molekülen der Vertebraten festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten die Eps8-Moleküle der Vertreter der Trematoden (*C. sinensis* und *S. mansoni*) eine sehr hohe Übereinstimmung der Sequenzen. Diese Ergebnisse ließen eine enge phylogenetische Beziehung zwischen den Molekülen der Trematoden vermuten, welche in einer anschließenden phylogenetischen Untersuchung in Form eines Cladogramms überprüft wurden. Um die Aussagekraft dieser Vermutung zu erhöhen, wurden die Moleküle mit Ähnlichkeit zu Eps8 von *S. japonicum* und *S. haematobium* (Sjp\_0116820; Sha\_102603) hinzugefügt. Bei der Sequenz von SjEps8 handelte es sich jedoch um eine Partialsequenz, wobei als strukturelle Domäne einzig die SH3-Domäne vorhanden war. Um eine Verschiebung der phylogenetischen Beziehungen auszuschließen, wurden für diese Analyse die jeweiligen SH3-Domänen der Moleküle bestimmt und anschließend zur Erstellung des Cladogramms verwendet (s. Abb. 3-14).



**Abbildung 3-14: Phylogenetisches Cladogramm der SH3-Domäne verschiedener Eps8-Moleküle**

Für die phylogenetische Anordnung wurden die annotierten Sequenzen (Accession Nummern) der Eps8-Moleküle von *D. melanogaster* (1: AAF21013 und 2: AAL13963), *A. mellifera* (XP\_392229), *C. elegans* (CAJ44244), *S. mansoni* (Prey-Sequenz), *S. haematobium* (Sha\_102603), *S. japonicum* (Sjp\_0116820), *C. sinensis* (GAA35243), *X. tropicalis* (NP\_0010702508), *H. sapiens* (Q12929), *M. musculus* (AAA16358), *G. gallus* (XP\_416405) und *D. rerio* (NP\_956536) verwendet. Oberer Bereich: Cladogramm; unterer Bereich: dazugehöriges Alignment der SH3-Domänen

Das Cladogramm der Eps8-Moleküle (s. Abb. 3-14) zeigte eine deutliche Trennung zwischen diesen Molekülen der Vertebraten und jenen der Invertebraten. Zwischen den Aminosäuren der Eps8-SH3-Domänen der Vertebraten wurde eine hohe Konservierung gefunden, die bereits im Alignment beobachtet wurde (vgl. Anhang 5.2.2). Im Bereich des Cladogramms der Invertebraten fiel eine deutliche Trennung zwischen den Molekülen der Vertreter der Trematoda und Insecta bzw. dem Nematoden *C. elegans* auf. Zusätzlich wurde eine Unterteilung der SH3-Domäne der Trematoden zwischen den Mitgliedern der Familie der Schistosomatidae und *C. sinensis* deutlich, daneben zeigten die SH3-Domänen von *S. mansoni* und *S. haematobium* eine engere Verwandtschaft auf als *S. japonicum*.

Ein weiteres Alignment des identifizierten SmEps8 Volllängenklons des Y3H-Screenings (Prey-Sequenz) beschäftigte sich mit dem Vergleich dieser Sequenz und den



annotierten Datenbankklonen (XP\_002574647, CCD60001). Dabei wurden Diskrepanzen zwischen den gefundenen Sequenzen sichtbar (vgl. Abb. 3-15).

Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	MRNRDFNKEELAFKAHHIASFIEGEEKLTPSSVVHHINLLHGGGRIDEPTCKVRLDKKGI MRNRDFNKEELAFKAHHIASFIEGEEKLTPSSVVHHINLLHGGGRIDEPTCKVRLDKKGI MRNRDFNKEELAFKAHHIASFIEGEEKLTPSSVVHHINLLHGGGRIDEPTCKVRLDKKGI *****	60 60 60
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	LIELRSSEEVVEFFEWSSISDQAAIFKRSEDFQYGYLILFRCSQYNAELGIKESEVHVFS LIELRSSEEVVEFFEWSSISDQAAIFKRSEDFQYGYLILFRCSQYNAELGIKESEVHVFS LIELRSSEEVVEFFEWSSISDQAAIFKRSEDFQYGYLILFRCSQYNAELGIKESEVHVFS *****	120 120 120
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	CETKDDAKLLVDSIYNQKISALGLNSNGDASRSPVNLRRGRSEIIDSTGYDGGGRNFYM CETKDDAKLLVDSIYNQKISALGLNSNGDASRSPVNLRRGRSEIIDSTGYDGGGRNFYM CETKDDAKLLVDSIYNQKISALGLNSNGDASRSPVNLRRGRSE----- *****	180 180 164
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	LNQCIDDIECFENRLEKAIKRMSHHNRNSSAEVLNNVSYPKQDAQEIIIRKVYAFNLNE LNQCIDDIECFENRLEKAIKRMSHHNRNSSAEVLNNVSYPKQDAQEIIIRKVYAFNLNE -----ELKFNVSYSPKQDAQEIIIRKVYAFNLNE * : *****	240 240 193
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	QIQPHTPEEISKKIFIRLFNTVQWLDKVCRHNIVPDYDQHMVREIVEPLLEEATLATIAK QIQPHIPEEISKKIFIRLFNTVQWLDKVCRHNIVPDYDQHMVREIVEPLLEEATLATIAK QIQPHIPEEISKKIFIRLFNTVQWLDKVCRHNIVPDYDQHMVREIVEPLLEEATLATIAK *****	300 300 253
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	RLQNKIEFWKGLGPAWNTPEKWEHLARYSPQFASKSVNKRQTHAEANIVTPSVGDVE RLQNKIEFWKGLGPAWNTPEKWEHLARYSPQFASKSVNKRQTHAEANIVTPSV---- RLQNKIEFWKGLGPAWNTPEKWEHLARYSPQFASKSVNKRQTHAEANIVTPSV---- *****	360 356 309
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	IKVTQTISPRHSPIPSERVTPSPVRQIGTETIPTDNVNTTVLNVTTVTVESPEQRVKS ---TQTISPRHSPIPSERVTPSPVRQIGTETIPTDNVNTTVLNVTTVTVESPEQRVKS ---TQTISPRHSPIPSERVTPSPVRQIGTETIPTDNVNTTVLNVTTVTVESPEQRVKS *****	420 413 366
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	ADPRSSYPQRRWDEEKWCVVNVLVHVGAKPQELTVQPGDVLQILNTSGDWWLLQNDAGE ADPRSSYPQRRWDEEKWCVVNVLVHVGAKPQELTVQPGDVLQILNTSGDWWLLQNDAGE ADPRSSYPQRRWDEEKWCVVNVLVHVGAKPQELTVQPGDVLQILNTSGDWWLLQNDAGE *****	480 473 426
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	SGEVPAAWKLAAYNRPDPHTTAGLKKTSPMNNLLSRKSTETFGNDSDNVHSENHSNFQSQ SGEVPAAWKLAAYNRPDPHTTAGLKKTSPMNNLLSRKSTETFGNDSDNVHSENHSNFQSQ SGEVPAAWKLAAYNRPDPHTTAGLKKTSPMNNLLSRKSTETFGNDSDNVHSENHSNFQSQ *****	540 533 486
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	RNNSHAPKSILRDKSPTRQTDTSVLNLSIPNSPTGQNSNNDNRIMNDNVNTNANNVMI RNNSHAPKSILRDKSPTRQTDTSVLNLSIPNSPTGQNSNNDNRIMNDNVNTNANNVMI RNNSHAPKSILRDKSPTRQ-----ILLIPNSPTGQNSNNDNRIMNDNVNTNANNVMI *****	600 593 541
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	TPSQLQEAIKINSNVPMLIPVFNLYSNNSDMSAINWSNLINPNTNGAELARTPNPDAL TPSQLQEAIKINSNVPMLIPVFNLYSNNSDMSAINWSNLINPNTNGAELARTPNPDAL TPSQLQEAIKINSNVPMLIPVFNLYSNNSDMSAINWSNLINPNTNGAELARTPNPDAL *****	660 653 601
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	GPGWKPAFILSTSATEALGYSPYFNYPTHMTMTRELRLSKMQLGGGTGLKSVP GPGWKPAFILSTSAT-----THMHTMTRELRLSKMQLGGGTGLKSVP GPGWKPAFILSTSAT-----THMHTMTRELRLSKMQLGGGTGLKSVP *****	720 700 648
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	TTLDKPDQRLSKYASKEEVAEWLVHQAQFSPKAIKALKGFKGIDLYTMNRTQLEQHVGP TTLDKPDQRLSKYASKEEVAEWLVHQAQFSPKAIKALKGFKGIDLYTMNRTQLEQHVGP TTLDKPDQRLSKYASKEEVAEWLVHQAQFSPKAIKALKGFKGIDLYTMNRTQLEQHVGP *****	780 760 708
Prey-Sequenz XP_002574647 CCD60001	CDELFYAFRG 791 CDELFYAFRG 771 CDELFYAFRG 719 *****	

**Abbildung 3-15: Alignment von SmEps8-Klonen identifiziert im Y3H-Screening (Prey-Sequenz) bzw. annotiert in der Datenbank (XP\_002574647 und CCD60001)**

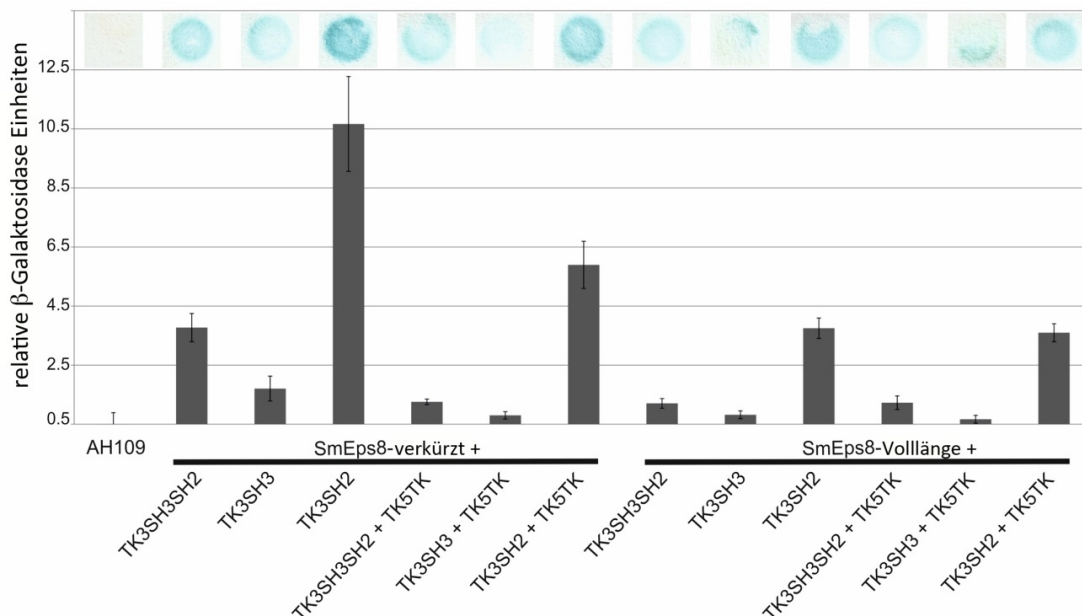
Das Alignment der drei Eps8-Klone zeigt Insertionen von Aminosäuren (AS) innerhalb der Prey-Sequenz, die bei in der Datenbank annotierten Klonen nicht vorhanden sind (-). Farblich markiert sind die konservierten Domänen: hellgrau: Phosphotyrosinbindedomäne (PTB, AS 8-151), dunkelgrau: EGFR-Bindedomäne (*Epidermal*

*growth factor receptor*-BD, AS 300-356), beige: Src Homologie 3 (SH3, AS 437-493), anthrazit: *sterile alpha motif-pointed* Effektordomäne (SAM-PNT, AS 718-790). Identische AS sind als \*, stark ähnliche AS sind als : dargestellt.

Generell besaß die *Prey*-Sequenz von SmEps8 eine größere Übereinstimmung (\*) auf AS-Ebene mit dem Klon der *Accession* Nummer XP\_002574647 (zu 97% identisch) als mit dem Klon der *Accession* Nummer CCD60001 (zu 90% identisch). Die detektierten Unterschiede der AS-Sequenzen beschränkten sich mit einer Ausnahme (AS an Position 743 der *Prey*-Sequenz) auf die Bereiche zwischen den farblich markierten, konservierten Domänen. Die *Prey*-Sequenz zeigte an den AS-Positionen 357-363 und 676-689 einen Einschub von Aminosäuren im Vergleich zu beiden annotierten Klonen. Weiterhin wurden Insertionen der *Prey*-Sequenz und des Klons XP\_002574647 an den AS-Positionen 165-211 und 561-565 gefunden, die in dem zweiten annotierten Klon (CCD60001) nicht vorhanden waren. Neben diesen Insertionen waren an verschiedenen Positionen Aminosäuren ausgetauscht. Hierzu gehörten die Aminosäuren 213-215, 560, 566 und 568 der *Prey*-Sequenz im Vergleich zum annotierten Klon mit der *Accession* Nummer CCD60001. Ein interessanter Aspekt war der Austausch der Aminosäure Phenylalanin (F) innerhalb der SAM-PNT Domäne der *Prey*-Sequenz (Position 743) in beiden annotierten Klonen durch ein Leucin (L). Trotz des Austausches von Phenylalanin handelte es sich bei dem eingebauten Leucin um eine Aminosäure mit einer hydrophoben Seitenkette, womit sich die Eigenschaft des Proteins an dieser Position nicht ändert.

SmEps8 wurde als putativer *upstream* Interaktionspartner der SH2-Domäne der Src-Kinase SmTK3 identifiziert (Buro et al., in Vorbereitung). Anhand von Co-Immuno-präzipitationsexperimenten am Mausmodell beschrieb Maa et al. (1999) die Interaktion von Eps8 mit v-Src. Dabei wurde die Interaktion über die SH3-Domäne von v-Src vermittelt. Sowohl die SH2-Domäne allein als auch in Kombination mit der SH3-Domäne führte bei diesen Experimenten zu keiner Verstärkung der Interaktion. Diese Ergebnisse widersprechen dem Ergebnis des durchgeführten Y3H-Screenings der SH2-Domäne von SmTK3 (mit Co-Expression der SmTK5TK), in dem SmEps8 identifiziert wurde. Aufgrund dieser Diskrepanz wurde die Interaktion von SmTK3 und SmEps8 mittels weiterer Y2/3H-Experimente genauer untersucht. Dafür wurden von den *prey*-Klonen sowohl die verkürzte als auch die Vollängenvariante mit unterschiedlichen Konstrukten der SmTK3 (TK3SH3SH2, TK3SH3, TK3SH2) in AH109-Zellen co-transformiert. Um den für die Interaktion notwendig erachteten phosphorylierten Zustand der Tyrosinreste zu berücksichtigen, wurden alle Kombinationen mit der SmTK5TK co-exprimiert. Im Anschluss an diese Co-Transformationen wurden sowohl

$\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filterassays als auch  $\beta$ -Gal Flüssigassays durchgeführt (Abb. 3-16). Als Negativkontrolle dienten untransformierte AH109-Zellen.



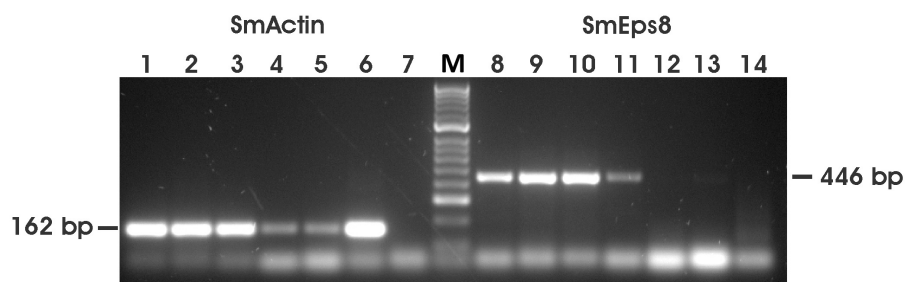
**Abbildung 3-16:  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filter- und  $\beta$ -Gal Flüssigassay der SmEps8- und SmTK3-Proteininteraktionen**

Im oberen Teil der Abbildung sind die  $\beta$ -Gal Filterassay Ergebnisse zu sehen, die Interaktionsintensitäten entsprechen den Farbintensitäten. Das Balkendiagramm zeigt die  $\beta$ -Gal Flüssigassay Ergebnisse. Die Normalisierung der Werte erfolgte anhand der Negativkontrolle (untransformierte AH109 Zellen). Die Interaktionen der verkürzten Variante des SmEps8-Moleküls wurde mit denen der Volllängenvariante unter Verwendung verschiedener Konstrukte der Src-Tyrosinkinase SmTK3 (TK3SH3SH2, TK2SH3, TK3SH2) verglichen. Zur Überprüfung des Einflusses des Phosphorylierungsgrades von Tyrosinresten wurde die SmTK5TK jeweils co-exprimiert (+TK5TK). [Akronyme: SH: Src Homologie TK: Tyrosinkinasendomänen; Eps8: EGFR pathway substrate 8]

Wie man der Abbildung (Abb. 3-16) entnehmen kann, wurden die stärksten Protein-Protein-Interaktionen für SmEps8 mit dem SmTK3SH2-Konstrukt identifiziert. Eine Verstärkung der relativen Bindungsstärken durch zusätzliche Expression der SmTK5TK konnte nicht beobachtet werden. Die geringste relative Interaktionsstärke wurde für die Zellen mit der SmTK3SH3 gemessen, dabei spielte die zusätzliche Tyrosinphosphorylierung ebenfalls keine Rolle. Die Kombination der beiden Domänen der SmTK3 (TK3SH3SH2) führte jeweils zu einer stärkeren Interaktion mit SmEps8 im Vergleich zu der Interaktion mit TK3SH3, aber einer insgesamt schwächeren als bei Verwendung des Konstruktes TK3SH2. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die relativen Interaktionsstärken des Volllängenkonstruktes von SmEps8 geringer als die der verkürzten Molekülvariante sind. Dieses Ergebnis kann durch eine vermeintliche Autoinhibierung aufgrund einer

intramolekularen Konformationsänderung der SH3-Domäne der Vollängenvariante erklärt werden (Disanza et al., 2004). Da die SH3-Domäne in der verkürzten Variante des Moleküls nicht vorhanden war, konnte eine ungehinderte und entsprechend stärkere Interaktion mit den Subfragmenten der SmTK3 erfolgen. Des Weiteren zeigten diese Versuche, dass der für diese Interaktion benötigte Bereich von SmEps8 sich auf die PTB-Domäne beschränkt, da in der verkürzten Variante des Moleküls nur dieser strukturelle Bereich vorhanden war.

Neben der detaillierten Untersuchung der Interaktion mit SmTK3, war die Analyse des Transkriptionsprofils von SmEps8 von Interesse. Mit Hilfe von RT-PCRs wurde die Transkription von SmEps8 in beiden Geschlechtern des Adultstadiums unabhängig von der Paarungserfahrung detektiert (vgl. Abb. 3-17, Spuren 8-11). Unter den gewählten Bedingungen war es nicht möglich, Transkripte von SmEps8 in den beiden freilebenden Larvenstadien zu detektieren (vgl. Abb. 3-17, Spuren 12,13). Als Referenz für diese RT-PCR wurde die Transkription von SmActin ebenfalls für alle Stadien des Lebenszyklus des Parasiten untersucht und wie erwartet in allen Stadien detektiert (s. Abb. 3-17, Spuren 1-7).



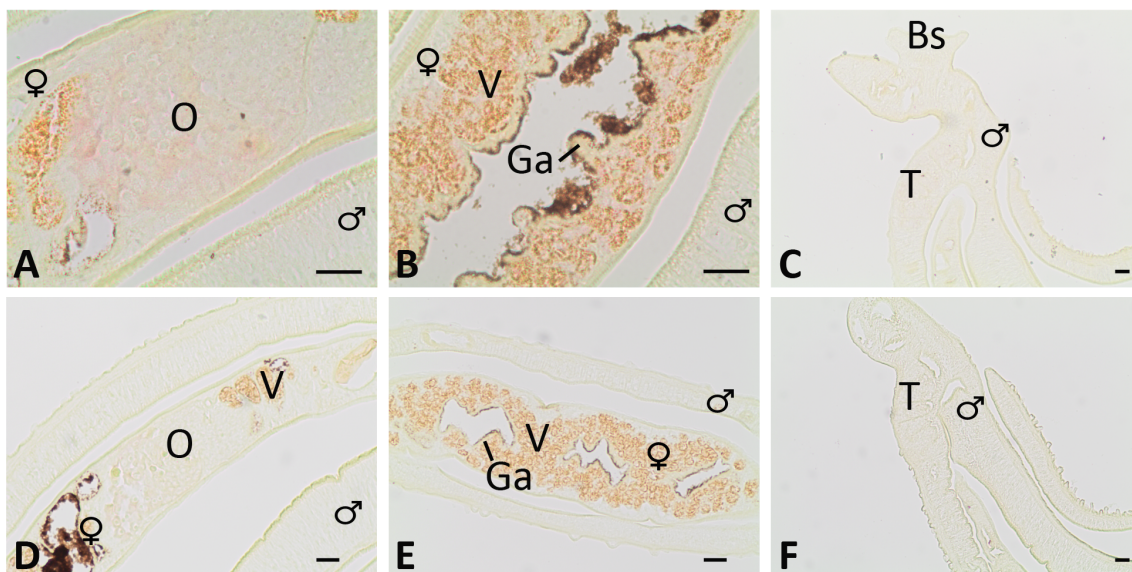
**Abbildung 3-17: Transkriptionsanalysen von SmEps8 und SmActin**

Von den untersuchten Stadien von *S. mansoni* wurde jeweils 1 µg RNA in die Reverse Transkription eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte besaßen für SmActin eine Größe von 162 bp (Spuren 1-6) und für SmEps8 von 446 bp (Spuren 8-13). Als *Template* für die PCR wurde cDNA (1:5 verdünnt) von immaturren Weibchen (Spuren 1, 8), immaturren Männchen (Spuren 2, 9), maturaen Weibchen (Spuren 3, 10), maturaen Männchen (Spuren 4, 11), Cercarien (Spuren 5, 12), sowie Miracidien (Spuren 6, 13) eingesetzt. Als Negativkontrollen der PCR wurden Ansätze ohne *Template* mitgeführt (Spuren 7, 14). M: Marker, HyperLadder I

Wie auch für SmTK3 konnte in diesen Experimenten die Transkription von SmEps8 im Adultstadium unabhängig von Geschlecht und Paarungserfahrung gezeigt werden. Ferner wurde die Transkription von SmEps8 in den Reproduktionsorganen (Vitellarium, Ovar und Testes) durch *in situ*-Hybridisierungen lokalisiert, womit eine Kolokalisation mit den Transkripten des Interaktionspartner SmTK3 bestand (durchgeführt von Dr. Cora Burmeister, AG Grevelding; Buro et al., in Vorbereitung; Kapp et al., 2004).

### 3.2.1.2 Untersuchung weiterer putativer Protein-Protein-Interaktionen von SmEps8

Bei homologen Proteinen des identifizierten SmEps8 handelt es sich um Proteine mit Interaktionspotential zu EGF-Rezeptoren (Fazioli et al., 1993), deshalb war die Untersuchung einer putativen Interaktion des Moleküls mit EGFRs aus *S. mansoni* von besonderem Interesse. Shoemaker et al. (1992) identifizierte den ersten schistosomalen EGFR (SER; Smp\_093930.x, Accession Nummer M86396), der von Ramachandran et al. (1996) näher charakterisiert wurde. Durch Immunlokalisierungen von adulten Schistosomen konnte eine bevorzugte Expression innerhalb der Muskeln im subtegumentalen Bereich gezeigt werden (Ramachandran et al., 1996). Zur Vervollständigung dieser Lokalisationsdaten wurden zusätzliche *in situ*-Hybridisierungen für SER durchgeführt (s. Abb. 3-18). Als *Template* für die Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden, für die anschließende Detektion der SER-Transkripte, diente der nicht konservierte Juxtamembran-Bereich des Moleküls (vgl. 0, Markierung).



**Abbildung 3-18: *In situ*-Lokalisation von SER auf Gewebeschnitten von adulten Schistosomen**

*In situ*-Hybridisierung für Digoxigenin-markierten Sonden des Juxtamembran-Bereichs des schistosomalen *Epidermal growth factor receptor* (SER) zeigten dessen Transkription in Ovar (A) und Vitellarium (B), aber nicht in den Testes (C). Als repräsentative Kontrollen wurden Sonden des gleichen Sequenzbereichs von SER zur Detektion von *antisense*-RNA verwendet (D-F). Die Aufnahmen erfolgten an einem CX-21 Mikroskop (Olympus) mit einer SC30 Kamera (Olympus) und der *cellSens Dimension* Software (Olympus). Scale bar: 20 µm [V: Vitellarium; O: Ovar; T: Testes; Ga: Gastrodermis; Bs: Bauchsaugnapf; ♀: Weibchen; ♂: Männchen]

Im Zuge dieser *in situ*-Hybridisierung wurden SER-Transkripte in den weiblichen Reproduktionsorganen Vitellarium und Ovar nachgewiesen, wonach eine Kolokalisation der

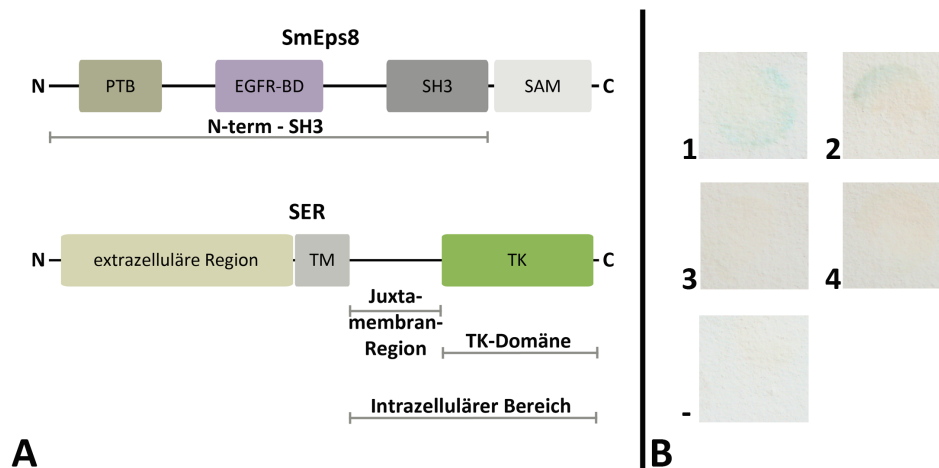
Transkription von SER, SmEps8 und SmTK3 innerhalb dieser beiden Organe besteht (vgl. Abb. 3-18; Buro et al., in Vorbereitung; Kapp et al., 2004).

Neben SER konnten zwei weitere Proteine mit Ähnlichkeit zu EGFRs im Genom von *S. mansoni* identifiziert werden (SER2: Smp\_165470 und SER3: Smp\_152680; Andrade et al., 2011; Avelar et al., 2011). Diese wurden bislang nicht weiter charakterisiert, stellen jedoch als Vertreter der schistosomalen EGFRs weitere putative Interaktionspartner von SmEps8 dar. Castagnino et al. (1995) zeigten anhand von Co-Immunopräzipitationen, dass Eps8 an den Juxtamembran-Bereich der EGFRs bindet. Dieser Bereich befindet sich zwischen der Transmembrandomäne (TM) und der TK-Domäne im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors und besitzt eine variable Größe in den drei EGFRs von *S. mansoni* (vgl. Sequenzen Anhang 0). Für eine Interaktion mit diesem Bereich ist die EGFR-BD von Eps8 notwendig. Im Eps8-Protein des Menschen wurde der Bereich der AS 298-362 als EGFR-BD identifiziert (Castagnino et al., 1995) und besteht im Wesentlichen aus drei Kernbereichen: dem N-terminalen Bereich mit Wiederholungen der Aminosäuren Lysin und Arginin, dem zentralen Bereich mit einer rollenreichen Region und dem C-terminalen Bereich, der durch eine spezifische Abfolge von Lysin und Histidin gekennzeichnet ist. Große Teile dieser AS-Sequenzen sind im SmEps8 vorhanden, wodurch eine Interaktion zwischen den identifizierten EGFRs und SmEps8 über die EGFR-BD möglich ist.

Zur Überprüfung der putativen Protein-Protein-Interaktion von SmEps8 mit den identifizierten EGFRs von *S. mansoni* wurden einzelne Subfragmente dieser Moleküle in entsprechende Hefektoren kloniert. Als Subfragment des SmEps8 diente der komplette N-terminale Bereich (einschließlich der PTB- und EGFR-BD) bis zum Ende der SH3-Domäne (pBridge; SmEps8 N-term-SH3; vgl. Abb. 3-19 A). Die Amplifikation der Rezeptoren beinhaltete den kompletten intrazellulären Bereich, d.h. der Juxtamembran-Bereich einschließlich des C-Terminus (vgl. Abb. 3-19 A). Für den Smp\_152680 (SER3) gelang die Amplifikation dieses Bereichs nicht, stattdessen wurden Konstrukte der putativen Einzelbereiche (Juxtamembran-Bereich und TK-Domäne) generiert. Die Probleme der Amplifikation des gesamten intrazellulären Bereichs dieses SERs könnten durch eine unvollständige Nukleinsäuresequenz in der Datenbank zustande kommen. Bei Untersuchung der genomischen Sequenz des Gens wurde ein langer N-reicher Bereich sichtbar. Diese Abschnitte entstehen bei der *in silico* Zusammensetzung verschiedener Partialsequenzen eines Gens, die jedoch keine Überlappungsbereiche aufweisen.

Alle Klonierungen wurden mit Hilfe von Sequenzierungen auf einen korrekten ORF überprüft und für Co-Transformationen in Hefezellen (AH109) verwendet. Durch die anschließende Wachstumsselektion der transformierten Hefen wurde nur eine schwache Interaktion der exprimierten Proteine festgestellt (Daten nicht gezeigt). Zur Validierung dieser Interaktionen der Proteine wurde ein  $\beta$ -Gal Filterassay durchgeführt (s. Abb. 3-19 B).





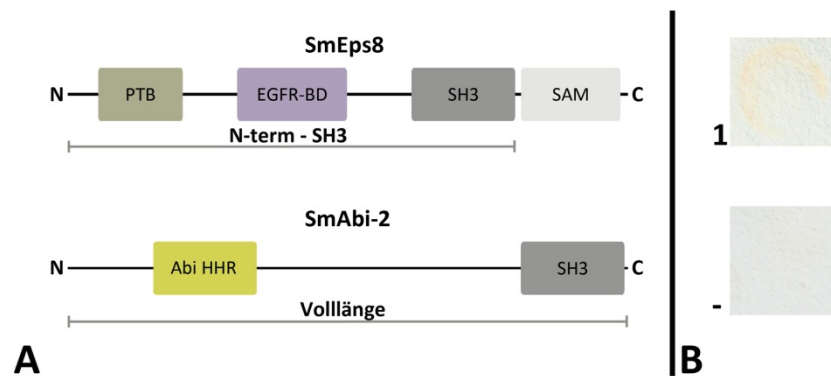
**Abbildung 3-19: Schematischer Aufbau von SmEps8 bzw. den SERs und Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filterassays von SmEps8-SER-transformierten AH109-Zellen**

(A): In den Y2H-Experimenten wurden der N-terminale Bereich (PTB-, EGFR-BD und SH3-Domäne; N-term-SH3) von SmEps8 und die vollständigen intrazellulären Bereiche von SER und SER2 verwendet. Von SER3 wurden nur die Subfragmente der Juxtamembran-Region und der TK-Domäne für diese Experimente amplifiziert und in pACT2 kloniert. (B): Ergebnisse der entsprechenden  $\beta$ -Gal Filterassays der Interaktionen von 1: SmEps8 und SER, 2: SmEps8 und SER2, 3: SmEps8 und Juxtamembran-Bereich des SER3, 4: SmEps8 und der TK-Domäne des SER3. Als Negativkontrolle (-) wurde ein  $\beta$ -Gal Filterassay von untransformierten AH109-Zellen durchgeführt. [Akronyme konservierter Domänen und allg. Abkürzungen: PTB: Phosphotyrosinbindedomäne; EGFR-BD: Epidermal growth factor receptor Bindedomäne; SH3: Src Homologie 3; SAM: sterile alpha motif; TM: Transmembrandomäne; TK: Tyrosinkinasendomänen; Eps8: EGFR pathway substrate 8; SER: Schistosome EGFR; N: N-Terminus; C: C-Terminus]

Anhand der  $\beta$ -Gal Filterassays wurden Interaktionen von SmEps8 mit den intrazellulären Bereichen von SER bzw. SER2 detektiert (vgl. Abb. 3-19, B: 1 und 2). Im Gegensatz dazu zeigten die Proteine der Subfragmente des Juxtamembran-Bereichs und der TK-Domäne des SER3 mit SmEps8 keine Interaktion (s. Abb. 3-19, B: 3 bzw. 4). Bei der Verwendung von untransformierten AH109-Zellen (Negativkontrolle) wurde, wie erwartet, keine Interaktion festgestellt. Eine Quantifizierung der identifizierten Interaktionen mit Hilfe eines  $\beta$ -Gal Flüssigassay war nicht möglich, was in diesen Fällen auf die geringere Sensitivität gegenüber dem  $\beta$ -Gal Filterassay zurückgeführt wurde (Clontech, 2002).

Eine weitere Eps8-Interaktion kann mit dem Molekül *Abelson interactor-1* (Abi-1) erfolgen und wird über die SH3-Domäne von Eps8 vermittelt (Biesova et al., 1997). Dabei bildet Abi-1 mit Eps8 und Sos-1 einen Komplex, der indirekt das Actin-Cytoskeletts remodelliert (Offenhäuser et al., 2004). Mongioví et al. (1999) identifizierten das atypische PxxDY-Bindemotiv (Aminosäuren DY sind essentiell für die Bindung) der SH3-Domäne von Eps8-Molekülen. Für die Überprüfung der Interaktion von SmEps8 mit einem Abi-1-Protein aus *S. mansoni* wurden Datenbankuntersuchungen durchgeführt und im Parasitengenom das Molekül SmAbi-2 (Smp\_085740) identifiziert. In einem Alignment von SmAbi-2 mit dem

humanen Abi-1 (*Accession* Nummer NP\_001171594) konnte das präferierte Bindemotiv der SH3-Domäne in der Sequenz des SmAbi-2 nicht gefunden werden, dennoch waren beide Moleküle zu 28% identisch (vgl. Alignment im Anhang 5.2.4). Aufgrund dieser hohen Konservierung wurde die Volllängensequenz des SmAbi-2 für Y2H-Analysen amplifiziert und in den Vektor pACT2 kloniert. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde ein korrekter ORF für SmAbi-2 ermittelt und dieses Konstrukt für eine anschließende Co-Transformation mit dem SmEps8-Konstrukt N-term-SH3 verwendet (vgl. Abb. 3-20 A). Die ersten Daten der Wachstumsselektion deuteten zunächst auf eine schwache Interaktion beider Moleküle hin (Daten nicht gezeigt). Zur Validierung der putativen Interaktion wurde ein  $\beta$ -Gal Filterassay durchgeführt (vgl. Abb. 3-20 B), wobei jedoch keine Protein-Protein-Interaktion zwischen SmEps8 und SmAbi-2 detektiert wurde.



**Abbildung 3-20: Schematischer Aufbau von SmEps8 und SmAbi-2 und Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filterassays von SmEps8-SmAbi-2-transformierten AH109-Zellen**

(A): In den Y2H-Experimenten wurde der N-terminale Bereich von SmEps8 (PTB-, EGFR-BD und SH3-Domäne; N-term-SH3; pBridge) mit dem vollständigen *Abelson interactor-2* Molekül von *S. mansoni* (SmAbi-2; pACT2) in AH109-Zellen co-transformiert. SmAbi-2 enthält dabei die konservierten Domänen Abi HHR und SH3. (B): Ergebnisse der entsprechenden  $\beta$ -Gal Filterassays von SmEps8 und SmAbi-2 (1) und untransformierten AH109-Zellen als Negativkontrolle (-). [Akronyme konservierter Domänen und allg. Abkürzungen: PTB: Phosphotyrosinbindedomäne; EGFR-BD: *Epidermal growth factor receptor*-Bindedomäne; SH3: *Src* Homologie 3; SAM: *sterile alpha motif*; Abi HHR: *Abi homeo-domain homologous region*; Eps8: *EGFR pathway substrate 8*; Abi-2: *Abelson interactor-2*; N: N-Terminus; C: C-Terminus]

Resümierend handelte es sich bei dem häufigsten *upstream* Interaktionspartner der Src-Tyrosinkinase SmTK3 um SmEps8. Die Interaktion beider Moleküle erfolgte zwischen der PTB-Domäne von SmEps8 und der SH2-Domäne von SmTK3. Beide Moleküle kolokalisieren in den weiblichen Reproduktionsorganen. Ferner bildet SmEps8 eine schwache Protein-Interaktion mit den intrazellulären Bereichen zweier schistosomaler EGFR-Moleküle (SER und SER2) aus. Durch zusätzliche *in situ*-Lokalisationen wurden Transkripte von SER ebenfalls in Ovar und Vitellarium gefunden, wodurch putative Protein-Protein-Interaktionen von



SmEps8 mit SmTK3 und der Rezeptortyrosinkinase SER in den Gonaden des Weibchens von *S. mansoni* stattfinden könnten.

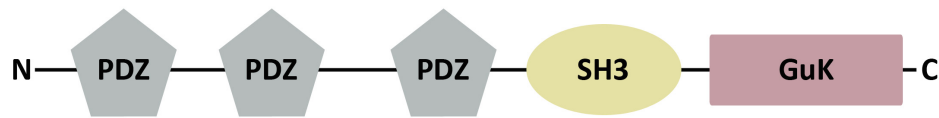
### 3.2.2 Protein-Protein-Interaktionen von SmTK6

Für die Identifikation putativer *upstream*-Interaktionspartner von SmTK6 führten Beckmann et al. (2011) ein Y3H-Screening einer cDNA-Bank mit der SH2-Domäne dieser Kinase durch, da diese Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste von *upstream*-Interaktionspartnern binden (Hubbard & Till, 2000). In diesem Screening wurde erneut die Bindung mit der Kinase SmTK3 identifiziert. Weitere Proteinbindungen von SmTK6SH2 konnten mit einem transmembranen Mucin (SmTmMuc1; Smp\_161910; *Accession* Nummer: XP\_002578516) und einem Zellpolaritätsprotein mit Ähnlichkeit zu *Discs large* (SmDLG, Smp\_170290; *Accession* Nummern: CCD76115, XP\_002579880) nachgewiesen werden. Bei anschließender Quantifizierung besaß die Interaktion der beiden Kinasen SmTK6 und SmTK3 die vergleichsweise stärkste Bindungsaffinität. Deutlich schwächere Interaktionen bestanden zwischen SmTK6 und SmTmMuc1, bzw. SmDLG (Beckmann et al., 2011). Obwohl die Interaktion mit SmDLG als relativ schwach eingestuft wurde, war die weitere Charakterisierung des Moleküls von Interesse, da *in situ*-Lokalisierungen eine gonaden-spezifische Transkription (Ovar, Vitellarium, Testes) dieses Gens zeigten (Beckmann et al., 2011). Über RT-PCR wurden zudem SmDLG in adulten Männchen und Weibchen sowie Miracidien detektiert, aber nicht in Cercarien.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten daher SmDLG sowie dessen putative Interaktionspartner näher charakterisiert werden.

#### 3.2.2.1 Strukturelle Charakterisierung des *Discs large* Moleküls (SmDLG)

Bei dem im Screening gefundenen SmDLG-Klon handelte es sich um eine Partialsequenz des Moleküls, bestehend aus einer N-Terminal verkürzten Variante. Die Aminosäuresequenz des Klons enthielt eine PDZ- (*Postsynaptic density* SD-95/SAP90, *Discs large* und *Zonula occludentes*-1), eine SH3- und eine C-terminal gelegene Guanylatkinase (GuK)-Domäne. Beckmann et al. (2011) vermuteten, dass die Interaktion mit der SH2-Domäne von SmTK6 über die PDZ-Domäne erfolgte. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Genomdaten konnte eine putative Vollängensequenz von SmDLG ermittelt werden (Smp\_170290; Protasio et al., 2012). Zur weiterführenden Charakterisierung dieses Moleküls wurde zunächst eine strukturelle Einteilung der Aminosäuresequenz des Vollängenmoleküls mit Hilfe des Programms SMART (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2012) vorgenommen (s. Abb. 3-21).



**Abbildung 3-21: Schematischer Aufbau des schistosomalen *Discs large* Proteins (SmDLG)**

Konservierte Domänen des Proteins SmDLG (Smp\_170290). Die Aminosäuresequenz enthält drei PDZ-Domänen an den Positionen 297-378, 640-719 und 975-1048, eine SH3-Domäne an Position 1162-1233 sowie eine GuK-Domäne an Position 1341-1551. [Akronyme konservierter Domänen und allg. Abkürzungen: PDZ: *Postsynaptic density* SD95/SAP90, *Disc large*, und *Zonula occludens-1* Protein; SH3: *Src* *Homologie* 3; GuK: *Guanylatkinase*-Domäne; N: N-Terminus; C: C-Terminus]

Die Volllängenvariante des SmDLGs wies im Gegensatz zu der N-terminal verkürzten Partialsequenz des im Screening gefundenen Klons drei PDZ-Domäne auf statt einer (s. Abb. 3-21). Die SH3- und GuK-Domänen waren ebenfalls in der Aminosäuresequenz der Voll-längenvariante vorhanden. Alle diese Domänen sind für DLG-Moleküle charakteristisch und besitzen unterschiedliche Funktionen, welche bislang jedoch nur für ähnliche Proteine anderer Organismen beschrieben wurden. Das PDZ-Motiv spielt eine wichtige Rolle als Protein-Protein-Erkennungsmodul und besitzt in den Metazoa eine hohe Konservierung innerhalb der sogenannten *Scaffold*-Moleküle (Harris & Lim, 2001), die als Adaptermoleküle verschiedene Signalmoleküle miteinander verbinden (Krauss, 2008). In detaillierten Analysen der einzelnen PDZ-Domänen von DLG aus *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass die zweite und dritte Domäne für die Wachstumsregulation notwendig sind und PDZ2 zusätzlich die Lokalisation des DLG-Proteins reguliert (Hough et al., 1997). Wie auch bei anderen Signalmolekülen erfolgt die Signalweiterleitung über die SH3-Domäne des Moleküls (Hubbard & Till, 2000), die als eine der wesentlichen Proteininteraktionsdomänen fungiert. Die GuK-Domäne stellt eine katalytisch inaktive Guanylatkinase-Domäne dar, die ebenfalls zu Proteininteraktionen beiträgt (Marcette et al., 2009).

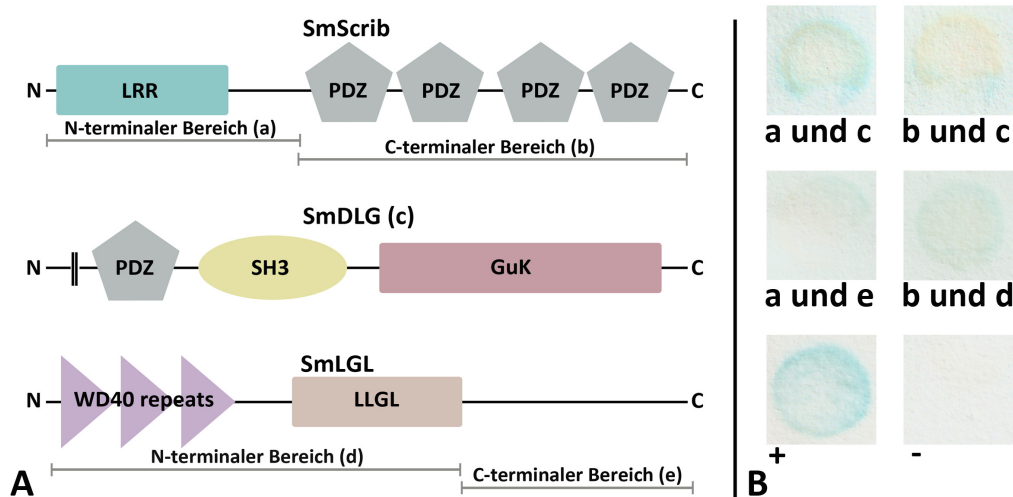
### 3.2.2.2 Untersuchungen von putativen *Discs large*-Interaktionen

DLG-Moleküle werden zur Klasse membranassoziierter Guanylat-Kinasen (MAGUKs) gezählt. Diese Moleküle besitzen unter anderem eine Funktion als Tumorsuppressorgene in *D. melanogaster* (Yamanaka & Ohno, 2008). Neben DLG existieren weitere Gene im Fliegen-genom, die ebenfalls als Tumorsuppressoren charakterisiert wurden (Badouel & McNeill, 2009). Dabei wurden zwei Gene entdeckt, die DLG-ähnliche Effekte bei mutationsbedingter Funktionsstörung in Fliegenlarven auslösten, *Scribble* (Scrib) und *Lethal giant larvae* (LGL). Aufgrund von Kolo-kalisierungsmustern und Funktionsstudien wurde für DLG, Scrib und LGL eine genetische und funktionale Assoziation postuliert (Bilder et al., 2000). Um proteinkodierende Gene von Scrib und LGL im Genom von *S. mansoni* zu identifizieren, wurden Datenbankanalysen durchgeführt. Dabei zeigten die Gene mit den

ID-Nummern Smp\_180220.2 und Smp\_104030.2 entsprechende Sequenzübereinstimmungen zu Scrib, allerdings wies die Smp\_180220.2 einen N-reichen Bereich auf. In der Datenbank entstehen N-reiche Bereiche, wenn Partialsequenzen eines Gens keinen Überlappungsbereich besitzen, aber dennoch zum selben Gen gehören. Aus diesem Grund wurde im Folgenden mit der Sequenz von SmScrib der Smp\_104030.2 gearbeitet (vgl. Anhang 5.2.5). In der aktuellen Version der Genomdaten wurde eine alternative Spleißvariante dieses SmScrib-Gens identifiziert, die jedoch für diese Arbeit aufgrund der späten Annotation nicht mehr berücksichtigt werden konnte (Smp\_104030.3; Protasio et al., 2012). Für LGL wurden zwei unterschiedlich große Gene im Genom identifiziert, wobei es sich um alternative Spleißvarianten handelt (Smp\_153310.1; Smp\_153310.2). Damit eine möglichst vollständige Variante des Gens verwendet wurde, diente die längere der beiden Sequenzen als Grundlage für folgende Y2H-Versuche (Smp\_153310.1). Somit sind die Komponenten eines potentiellen trimeren DLG-Scrib-LGL-Komplexes vorhanden. Um die putativen Interaktionen dieser Moleküle zu überprüfen, sollten Y2H-Experimente mit Teilkonstrukten von SmDLG, SmScrib und SmLGL durchgeführt werden. Dies geschah unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass Interaktionen von DLG und Scrib in Synapsen von *D. melanogaster* und humanen Epithelien in der Regel über das sogenannte GuK-Holder Adaptorprotein erfolgen (Mathew et al., 2002; Humbert et al., 2003; Katoh & Katoh, 2004; Assémat et al., 2008). Für dieses Adaptermolekül konnte jedoch im Schistosomengenom kein ähnliches Protein identifiziert werden, weshalb eine direkte Interaktion der beiden Moleküle SmDLG und SmScrib vermutet wurde. Diese ist denkbar, da in beiden Molekülen das Bindungsmotiv der PDZ-Domänen identifiziert wurde, welches aus der Aminosäuresequenz S/TxV/L (x repräsentiert dabei jede beliebige Aminosäure) besteht. Die Interaktion von Scrib und LGL erfolgt in Säugerzellen direkt, wobei es zur Ausbildung eines  $\beta$ -Propellers der WD40-Wiederholungen von LGL kommt und somit ein Modul für Protein-Protein-Interaktionen generiert wird (Kallay et al., 2006; Assémat et al., 2008).

Unter Berücksichtigung dieser Hinweise wurden die schistosomalen Proteine in die Gal4-Vektoren pBridge, pACT2 bzw. pGADT7-Rec kloniert. Hierfür wurde der identifizierte Partialklon von SmDLG verwendet (vgl. Abb. 3-22 A; c; 1562 bp). Aufgrund der für Klonierungen ungünstigen Größen der Moleküle SmScrib und SmLGL (SmScrib: 3405 bp; SmLGL: 3189 bp) wurden diese in Partialklone unterteilt. Dabei enthielt der N-terminale Bereich (1653 bp) von SmScrib die leucinreichen Wiederholungen (LRR) und der C-terminale Bereich mit einer Größe von 1752 bp die PDZ-Domänen. Bei der Unterteilung des SmLGL-Gens wurden die konservierten Domänen der WD40-Wiederholungen und die namensgebende LLGL-Domäne in den N-terminalen Bereich kloniert (1908 bp), während der C-terminale Bereich mit einer Größe von 1281 bp keine weiteren konservierten Domänen enthielt. Die AH109-Zellen wurden co-transformiert mit SmScrib (a oder b) und SmDLG (c),

bzw. SmLGL (d oder e), einer Wachstumsselektion unterzogen und anschließend in  $\beta$ -Gal Filterassays untersucht (Clontech, 2002; s. Abb. 3-22 B).



**Abbildung 3-22: Schematischer Aufbau von SmScrib, SmDLG und SmLGL und erste Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filterassays dieser Interaktionsstudien**

A: Bei den Y2H-Experimenten wurden verschiedene Bereiche von SmScrib (a, b), SmDLG (c) und SmLGL (d, e) in AH109-Zellen co-transformiert. SmScrib wurde unterteilt in den N-terminalen Bereich (a; inklusive der LRR) und den C-terminalen Bereich (b; inklusive der 4 PDZ-Domänen). Der Partialklon von SmDLG (c) beinhaltet eine PDZ-, eine SH3- und eine GuK-Domäne. Der N-terminale Bereich von SmLGL (d) enthielt die konservierten Bereiche der WD40-Wiederholungen und der LLGL-Domäne, der C-terminale Bereich des SmLGLs (e) keine konservierten Domänen. B: Ergebnisse der  $\beta$ -Gal Filterassays der Y2H-Versuche des N-terminalen Bereichs von SmScrib und des Partialklons SmDLG (a und c), des C-terminalen Bereichs von SmScrib und des Partialklons SmDLG (b und c), des N-terminalen Bereichs von SmScrib und des C-terminalen Bereichs von SmLGL (a und e), sowie des C-terminalen Bereichs von SmScrib und des N-terminalen Bereichs von SmLGL (b und d). Als Positivkontrolle (+) diente die Interaktion von SmTK6SH2 und SmDLG, als Negativkontrolle (-) untransformierte Hefezellen AH109. [Akronyme konservierter Domänen und allg. Abkürzungen: LRR: *Leucin rich repeats* (leucinreiche Wiederholungen); PDZ: *Postsynaptic density* SD95/SAP90, *Disc large*, und *Zonula occludens-1* Protein; SH3: *Src Homologie 3*; GuK: *Guanylatkinase*-Domäne; WD40 repeats: Wiederholungen der Aminosäuren W (Tryptophan) und D (Aspartat); LLGL: *Lethal giant larvae 2 domain*; N: N-Terminus; C: C-Terminus]

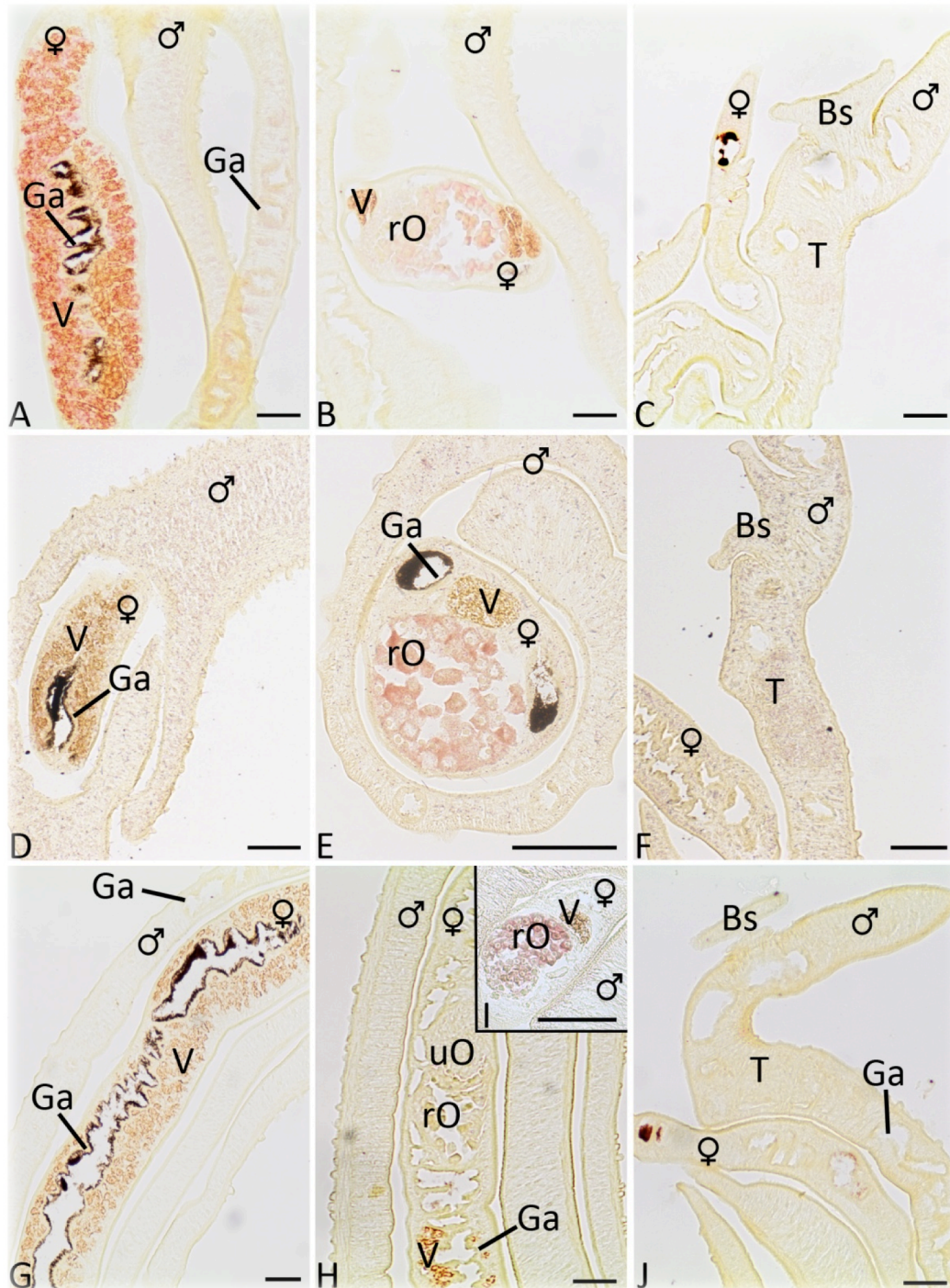
Im Vergleich zur Positivkontrolle (SmTK6SH2 und SmDLG; +) waren die gefundenen Protein-Protein-Interaktionen eher schwach (s. Abb. 3-22 B). Aus diesem Grund wurde auf den weniger sensitiven  $\beta$ -Gal Flüssigassay verzichtet und nur die repräsentativen  $\beta$ -Gal Filterassay-Daten gezeigt (Clontech, 2002). Eine minimal stärkere Interaktion wurde bei Verwendung des N-terminalen Bereichs von SmScrib und SmDLG (a und c) detektiert, als unter Benutzung des C-terminalen Bereichs von SmScrib (b und c). Im Gegensatz zu diesen Interaktionen wurde bei Verwendung des C-terminalen Bereichs von SmScrib und des N-terminalen Bereichs von SmLGL (b und d) eine stärkere Interaktion detektiert, als bei Verwendung des N-terminalen Bereichs von SmScrib und des C-terminalen Bereichs von SmLGL (a und e). Wie erwartet zeigten die untransformierten AH109-Zellen weder eine

Blauverfärbung (-) noch ein Zellwachstum auf den verwendeten Interaktionsselektionsplatten (SD-L-T-H; Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Versuchen lässt sich eine schwache, aber dennoch bestehende Interaktion der drei Moleküle ableiten. Um diese Aussage zu stützen, sollten weitere Versuche durchgeführt werden.

### **3.2.2.3 Analyse der Expressionsorte von SmScrib und SmLGL**

Damit die im vorherigen Kapitel beschriebene Interaktion zwischen SmDLG, SmScrib und SmLGL auch *in vivo* zustande kommt, ist die Transkription und anschließende Expression dieser Moleküle in den gleichen Organen unbedingt notwendig. Aufgrund fehlender Antikörper gegen diese Moleküle sollten die jeweiligen Transkriptionsorte genauer untersucht werden. Dafür wurden *in situ*-Hybridisierungen von adulten maturen Schistosomen mit genspezifischen Sonden für nicht konservierte Bereiche der Moleküle SmScrib und SmLGL durchgeführt (s. Anhang 5.2.5, Markierung; vgl. Abb. 3-23). Bereits im Vorfeld waren *in situ*-Hybridisierungen von SmDLG durchgeführt worden (Beckmann et al., 2011), wobei die Transkription dieses Moleküls in den weiblichen Reproduktionsorganen Ovar und Vitellarium sowie in den Testes der Männchen detektiert wurde.



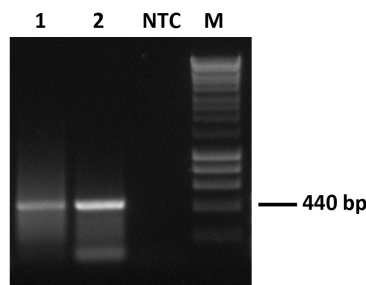
**Abbildung 3-23: *In situ*-Lokalisation von Scribble (SmScrib) und *Lethal giant larvae* (SmLGL) auf Gewebeschnitten von adulten Schistosomen**

*In situ*-Hybridisierung für Digoxigenin-markierte Sonden für die Gene SmScrib (A-C) und SmLGL (D-F) auf 5 µm-Semidünnschnitten adulter Schistosomenpaare mit dem Fokus auf den Reproduktionsorganen. Als repräsentative Kontrollen wurden Sonden der gleichen Sequenzbereiche zur Detektion von *antisense*-RNA für SmScrib (G, H, J) sowie für SmLGL (I) verwendet. Die Aufnahmen erfolgten an einem CX-21 Mikroskop (Olympus) mit einer SC30 Kamera (Olympus) und der *cellSens Dimension* Software (Olympus). *Scale bar*: 50 µm [V: Vitellarium; Ga: Gastrodermis; rO: reife Oocyten; uO: unreife Oocyten; Bs: Bauchsaugnapf; T: Testes; ♀: Weibchen; ♂: Männchen]



Die Transkription von SmScrib erfolgte innerhalb der weiblichen Reproduktionsorgane (Vitellarium, A; Ovar, B), wie auch in einigen Versuchen in den Testesloben der Männchen (C). Auch die Transkripte des SmLGL-Gens wurden im Ovar (E) und teilweise im Vitellarium (D) sowie in den Testes (F) gefunden. Für beide Moleküle dienten die entsprechenden *sense*-Sonden als Kontrollen bei den Versuchen, wobei diese putativ vorhandene *antisense*-RNA detektieren können. Dabei zeigte die Sonde für Scrib keine Signale (G, H, J), auch die Sonde für LGL führte mit Ausnahme des Ovars (I) zu keiner Detektion von *antisense*-RNA. Diese Ergebnisse zeigen eine Kolo-kalisation der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL im Ovar und Vitellarium und stellen einen weiteren Hinweis auf die bereits im Y2H-System gefundene direkte *in vivo* Interaktion der drei Moleküle dar.

Aufgrund der gefundenen SmLGL-Signale im Ovar bei Verwendung der *sense*-Sonde wurde das Vorhandensein einer *antisense*-RNA vermutet. Zur Überprüfung einer *antisense*-RNA dieses Gens wurden zusätzliche strangspezifische RT-PCRs durchgeführt. Dafür wurde zunächst RNA von adulten Schistosomenpaaren isoliert und mit einem SmLGL-spezifischen 3'-Primer bzw. 5'-Primer (vgl. Primersequenz Kapitel 2.1.7; LGLH\_ish-Primer) in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte eine PCR mit der amplifizierten cDNA, bei der jeweils ein Produkt von 440 bp erwartet wurde (s. Abb. 3-24).



**Abbildung 3-24: Strangspezifische RT-PCRs zur Detektion von SmLGL *sense*- und *antisense*-Transkripten**

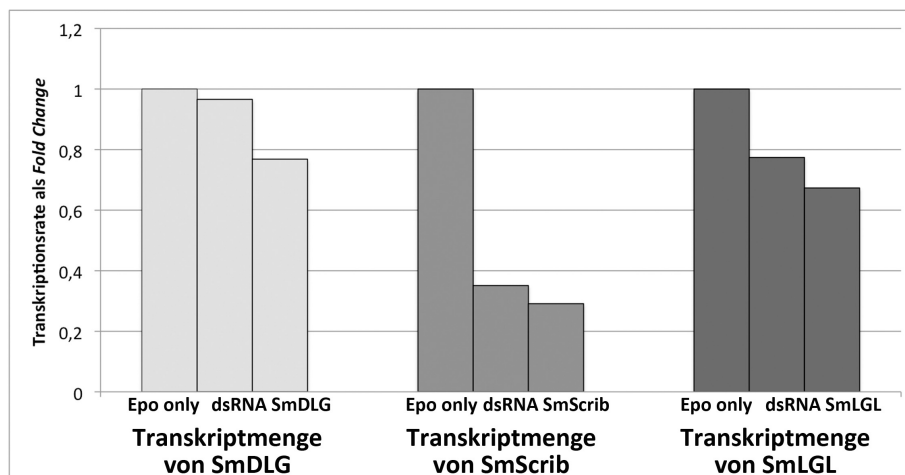
Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng RNA adulter Schistosomen verwendet und mittels Thermoscript™ (Invitrogen) und entsprechender Primer (5'-LGL\_ish (1) bzw. 3'-LGL\_ish (2)) in cDNA umgeschrieben. In die anschließende PCR wurden 5 µl dieser unverdünnten cDNA als *Template* eingesetzt, sowie die Primer 5'-LGL\_ish und 3'-LGL\_ish. Das erwartete Amplifikationsprodukt von 440 bp wurde mittels einem 1% igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht mit EtBr sichtbar gemacht. 1: RT-PCR-Produkt für SmLGL mit *antisense*-RNA als *Template*; 2: RT-PCR-Produkt für SmLGL mit *sense*-RNA als *Template*; NTC: *No Template Control* (Negativkontrolle der PCR); M: Marker, HyperLadder I

Mit Hilfe dieser strangspezifischen RT-PCRs konnte ein weiterer Hinweis für das Vorhandensein von *antisense*-RNA für SmLGL erbracht (vgl. Abb. 3-24, 1) und damit die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung verifiziert werden. Im Vergleich zur mRNA von SmLGL

(2) ist unter den gewählten Bedingungen das Signal der *antisense*-RNA jedoch deutlich schwächer.

### 3.2.2.4 Weitere funktionelle Analysen der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL

Neben den Y2H-Experimenten wurden für SmDLG, SmScrib und SmLGL weitere funktionelle Analysen in Form von RNA Interferenz (RNAi)-Versuchen zur posttranskriptionellem Suppression dieser Moleküle durchgeführt. Für die Synthese jeweiliger dsRNAs wurden nicht konservierte Bereiche der entsprechenden Gene als *Templates* ausgewählt (s. Anhang 5.2.5, Markierung), wobei diese unterschiedliche Größen besaßen (SmDLG: 765 bp; SmScrib: 903 bp; SmLGL: 1294 bp). Unter Verwendung einer T7-DNA-abhängigen RNA-Polymerase wurden diese Bereiche nach erfolgreicher Amplifikation *in vitro* translatiert. Anschließend erfolgte in einen *Annealing*-Schritt die Herstellung der dsRNA, welche mittels Elektroporation in adulte Schistosomenpaare transferiert wurden (Ndegwa et al., 2007; Krautz-Peterson et al., 2007; Beckmann et al., 2010b). Die veränderten Transkriptionsraten wurden im Anschluss durch RT-PCRs quantitativ ermittelt für SmDLG und SmScrib, bzw. semiquantitativ für SmLGL (s. Abb. 3-25).



**Abbildung 3-25: Ergebnisse der (semi)quantitativen RT-PCRs zur Bestimmung der Transkriptionsrate aus RNAi-Experimenten adulter Schistosomen mit dsRNAs gegen SmDLG, SmScrib bzw. SmLGL**

Die veränderten Transkriptionsraten der Gene SmDLG, SmScrib und SmLGL nach RNAi-Experimenten wurden in (semi)quantitativen RT-PCRs bestimmt. Als Kontrollen wurden Würmer genutzt, die ohne dsRNAs für die Elektroporation verwendet wurden (Epo only). Die Transkriptmengen der Gene SmDLG und SmScrib wurden mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode quantitativ und die des Gens SmLGL semiquantitativ ermittelt. Als Referenz der quantitativen Bestimmung diente die Transkriptmenge von SmActin und die von SmPDI für die semiquantitative. Anzahl der biologischen Replikate dieser RNAi-Versuche war  $n = 2$ . [DLG: *Discs large*; Scrib: *Scribble*; LGL: *Lethal giant larvae*]



Durch Anwendung der RNAi-Technik war es möglich, die Transkriptionsraten der Gene SmDLG, SmScrib und SmLGL zu reduzieren (s. Abb. 3-25). Dabei gelang es im Vergleich zur Kontrolle (Epo only) die Transkriptionsrate von SmDLG auf 97% bzw. 77% zu reduzieren. Eine deutlich stärkere Suppression der Transkription wurde für SmScrib (auf 35% bzw. 29%) im Vergleich zur Kontrolle gefunden. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR wurde eine Reduktion der SmLGL-Transkription auf 77% bzw. 76% ermittelt. Aufgrund dieser Reduktion der Transkripte aller drei Gene wurden adulte Schistosomen, die zuvor für die RNAi-Versuche genutzt wurden, in AFA fixiert und für phänotypische Untersuchungen eingesetzt, um potentielle morphologische Veränderungen zu identifizieren. Dazu wurden die Würmer mit Carminrot gefärbt und anschließend mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie untersucht. Bei dieser Untersuchung wurde für keines der supprimierten Gene eine phänotypische Veränderung im Vergleich zur Kontrollen gefunden (Daten nicht gezeigt), trotz der teils starken Reduktion der Transkriptlevel (vgl. Abb. 3-25, SmScrib).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Genom von *S. mansoni* Proteine mit Sequenzübereinstimmungen zu den aus *D. melanogaster* bekannten Tumorsuppressorgenen DLG, Scrib und LGL identifiziert wurden. In ersten funktionellen Analysen konnte SmDLG als *upstream* Interaktionspartner von SmTK6 detektiert werden (Beckmann et al., 2011). Des Weiteren konnten schwache direkte Interaktionen ohne zwischengeschaltete Adaptermoleküle von SmScrib und SmDLG, sowie SmLGL ermittelt werden. Alle drei Moleküle kolokalisieren vorwiegend in den Reproduktionsorganen von *S. mansoni*. Die Reduktion der Transkriptmenge dieser Gene durch dsRNA-basierte Verwendung der RNAi-Technik war möglich, wobei die Reduktionsstärken variierten. Diese Reduktionen der Transkriptmengen führten jedoch nicht zur phänotypischen Veränderung der dsRNA-behandelten Würmer.

## 4 Diskussion

### 4.1 *In vitro* Inhibitorbehandlungen adulter Schistosomen

Im Zuge der Charakterisierung verschiedener Mitglieder der TGF $\beta$ - oder CTK-Familien in *S. mansoni* standen funktionelle Studien im Mittelpunkt. Dabei konnten für SmT $\beta$ RI (Davies et al., 1998) und SmTK3 (Kapp et al., 2004) verschiedene Bindungspartner identifiziert werden (Osman et al., 2001; Beall & Pearce, 2001; Knobloch et al., 2004; LoVerde et al., 2007; Quack et al., 2009; Beckmann et al., 2010a, Beckmann et al., 2010b, Beckmann et al., 2011). Diese Bindungspartner gaben Hinweise auf mögliche Signalwege in die SmT $\beta$ RI bzw. SmTK3 involviert sind. Zusätzlich wurden bereits erste *in vitro* Versuche mit Inhibitoren durchgeführt (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007), die z.B. nach einer TRIKI-Behandlung eine konzentrationsabhängige Reduktion der Eiproduktion sowie der mitotischen Aktivität in adulten Schistosomenweibchen zeigten. Dieser Effekt zeigte sich verstärkt auch nach einer Behandlung mit Herb A. Ferner kam es unter Herb A-Einfluss zu einer erhöhten Transkription des Eischalvorläufergens p14, einer Destabilisierung der SmTK3 sowie einer verringerten Tyrosinphosphorylierung (Knobloch et al., 2006). Durch Kombination beider Inhibitoren war die Ausprägung der Reduktionen der Oviposition und mitotischen Aktivität behandelter Weibchen am stärksten (Knobloch et al., 2007). Daher wurde auf eine Kooperation der Signalwege geschlossen, in die SmT $\beta$ RI und SmTK3 involviert sind.

#### 4.1.1 Inhibierung der Kinaseaktivität durch den Einsatz von TRIKI

Zur Überprüfung der Inhibition des schistosomalen T $\beta$ RI durch TRIKI wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit seine Kinaseaktivität in *X. laevis* Oocyten untersucht. In diesem System wurden eine konstitutiv aktive sowie inaktive Form des Rezeptors exprimiert, wobei nur die aktive Form einen GVBD auslöste. Die Verwendung von TRIKI ab einer aufsteigenden Konzentration von 30 nM führte zur spezifischen Inhibierung der aktiven Rezeptorform. Für die *in vitro* Versuche mit adulten Schistosomen wurde die zehnfache TRIKI-Konzentration eingesetzt, da in vorherigen Studien bei 300 nM ein stärkerer Effekt beobachtet wurde als im Vergleich zu 150 nM (Knobloch et al., 2007). Weiterhin wurde *in vitro* mit komplexen Organismen gearbeitet, statt wie in den GVBD-Experimenten mit isolierten Oocyten, weshalb für eine vergleichbare Wirkungsweise bei der Behandlung adulter Schistosomen die TRIKI-Konzentration verzehnfacht wurde.

Um eine zusätzliche Inhibierung anderer Mitglieder der TGF $\beta$ -Rezeptorfamilie ausschließen zu können, sollten zukünftig vergleichbare Experimente mit BMP- und Activin-Rezeptoren durchgeführt werden, die kürzlich im Genom von *S. mansoni* identifiziert

worden sind (Protasio et al., 2012). Für eine Vielzahl an humanen Proteinkinasen (insgesamt 123) wurde die spezifische Wirkung verschiedener TGF $\beta$ - und BMP-Inhibitoren, darunter TRIKI, *in vitro* getestet (Vogt et al., 2011). Im Vergleich beider Inhibitorarten (TGF $\beta$ - bzw. BMP-Inhibitoren) konnte zwar eine höhere Sensitivität der TGF $\beta$ -Inhibitoren festgestellt werden, jedoch besitzen auch diese Inhibitoren das Potenzial, andere Proteinkinasen zu inhibieren. Diese unspezifische Wirkung für TRIKI wurde bei Konzentrationen von 0,11  $\mu$ M bis 44  $\mu$ M beobachtet (Vogt et al., 2011). Hier muss berücksichtigt werden, dass es sich um humane Proteinkinasen handelt, die zwar hohe Ähnlichkeit zu den Homologen aus *S. mansoni* aufweisen, aber nicht vollständig identisch sind. Dennoch kann eine unspezifische Wirkung von TRIKI in der erhöhten Konzentration von 300 nM auf weitere Kinasen des Parasiten nicht ausgeschlossen werden, was aber in weiteren Experimenten überprüft werden kann. Hierfür stellen Kinaseassays in *X. laevis* Oocyten eine geeignete Methode dar.

#### **4.1.2 Vergleichende Untersuchungen der Eiproduktion und mitotischen Aktivität nach vorangegangenen *in vitro* Inhibitorbehandlungen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach der *in vitro* Kultivierung adulter Schistosomen die Eiproduktion und die mitotische Aktivität bestimmt und mit den Ergebnissen von Knobloch et al. (2007) verglichen. Dabei konnten in dieser Arbeit jedoch keine signifikanten Unterschiede der Eiproduktion zwischen den entsprechenden Inhibitorbehandlungen festgestellt werden, da starke Schwankungen der Eizahlen auftraten (vgl. Abb. 3-3). Schwankungen der Ovipositionsrate wurden bereits in anderen Studien beobachtet, wobei diese von verschiedenen *in vitro* Kultivierungsfaktoren stark beeinflusst wird (Barth et al., 1996; el Ridi et al., 1997). Ferner wurde gezeigt, dass auch der Immunstatus des Endwirts den Reifegrad sowie die Fertilität der Schistosomen und folglich deren Ovipositionsrate beeinflusst (el Ridi et al., 1997). Da für die Experimente der vorliegenden Arbeit und von Knobloch et al. (2007) zwar Hamster der gleichen Gattung, aber unterschiedlicher Zuchtlinien genutzt wurden, können Unterschiede der Immunantwort nicht ausgeschlossen werden. Die *in vitro* Eiproduktion wird zusätzlich durch das der Kultur zugesetzte Serum beeinflusst (Newport & Weller, 1982; Bosshardt & Damian, 1986; Barth et al., 1996; el Ridi et al., 1997; Meyer et al., 1970). Die Zusammensetzung des Serums kann variieren und verschiedene Serumfaktoren können zur Inhibierung der Oviposition führen (Bosshardt & Damian, 1986). In den verschiedenen *in vitro* Experimenten der vorliegenden Arbeit und von Knobloch et al. (2006) wurden unterschiedliche Seren (NCS, FCS) eingesetzt. Zwar wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit ausschließlich NCS verwendet, jedoch stammte dieses nicht aus der gleichen Charge und damit von den gleichen Tieren, wodurch es in der Zusammensetzung variieren kann. Die unterschiedlichen Seren sowie deren Variationen in

der Zusammensetzung können daher mit verantwortlich für die beobachteten unterschiedlich starken Inhibitoreffekte sein.

Als zusätzlicher Messparameter der Inhibitorbehandlungen wurde die mitotische Aktivität bestimmt. Auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen den Experimenten der vorliegenden und der vorangegangenen Arbeit (vgl. Abb. 3-4, Abb. 3-5). Diese Unterschiede könnten durch mögliche Fehlerquellen der hier genutzten DAPI/BrdU-Methode (Knobloch et al., 2002b) erklärt werden. Als Hauptursache der Schwankungen zählt die entsprechende Dokumentation der DAPI-Färbung und des BrdU-Signals im Immunoblot für die anschließende densitometrische Bestimmung der relativen DNA-Menge des eingebauten BrdUs, die nicht standardisiert wurde. Für die optimale Dokumentation dürfen beide Intensitätssignale nicht gesättigt sein, wobei diese Einschätzung im eigenen Ermessen liegt und eine entsprechend große Fehlerquelle darstellt. Die DAPI-Färbung wird während eines bis zu 16-stündigen Waschschruttes dokumentiert, dessen Dauer manuell bestimmt wird. Ebenfalls ist die Dauer der Expositionszeit der Autoradiographie des BrdU-Signals kritisch zu betrachten, da auch diese nicht standardisiert werden kann. Diese Versuche lagen jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit und wurden deshalb nicht unter Berücksichtigung dieser Fehlerquellen wiederholt, sondern dienten lediglich als Richtwerte für die Inhibitorbehandlungen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten DAPI/BrdU-Versuche lieferten daher keine statistisch signifikanten Daten, die die vorherigen Ergebnisse reproduzieren oder widerlegen konnte.

### **4.1.3 Morphologische Veränderungen adulter Schistosomen durch Inhibitorbehandlungen**

Im Fokus dieser Untersuchungen standen zunächst die Reproduktionsorgane der Parasiten, da die Transkription der Zielmoleküle (SmT $\beta$ RI und SmTK3) beider Inhibitoren in diesen Organen lokalisiert wurde (Knobloch et al., 2004; Kapp et al., 2004). Aufgrund der reduzierten Mitoserate behandelter Schistosomenweibchen (Knobloch et al., 2007) war das Vitellarium als Organ mit der höchsten mitotischen Aktivität (Den Hollander & Erasmus, 1984) von besonderem Interesse. Erste Beobachtungen der Reproduktionsorgane nach erfolgter Herb A-Behandlung zeigten Veränderungen in ihrer Morphologie (Beckmann et al., 2010a). Dabei wurde eine löchrige Struktur des Vitellarium mit geringerer Anzahl an Vitellocyten, viele reife Oocyten und deren Verschiebung in den anterioren Bereich des Ovars, sowie eine reduzierte Anzahl an Spermien innerhalb der ventralen Bereiche der Testisloben und der Samenblase beobachtet. Entgegen dieser Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen in den Reproduktionsorganen gefunden werden, selbst nicht bei einer Verlängerung des Behandlungszeitraumes. Auch hier können biologische Varianzen der behandelten Würmer oder der Kultivierungsbedingungen eine

Rolle spielen. Diese Erklärung ist denkbar, da ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Eiproduktion (vgl. Kapitel 4.1.2) ermittelt wurden. Die von Beckmann et al. (2010a) beschriebenen Veränderungen zeigten jedoch auch bei diesen Parasiten unterschiedliche Ausprägungen (persönliche Mitteilung).

Was nach 5- bzw. 6-tägiger Behandlung mit Herb A einzeln bzw. in Kombination mit TRIKI jedoch gefunden wurde, war eine stark veränderte Struktur der Gastrodermis (s. Abb. 3-7). Dabei kam es zur bläschenartigen Abschnürungen des Gewebes in das Darmlumen bzw. zur Ablagerung von Abbauprodukten. Hingegen führte die Einzelbehandlung mit TRIKI zu keiner Veränderung der Darm-Morphologie.

Bei Herb A handelt es sich um einen Src-Tyrosinkinasen-Inhibitor (Uehara et al., 1989a; Uehara et al., 1989b; Fukazawa et al., 1991). Durch Genomanalysen von *S. mansoni* wurden drei Gene gefunden, die für Proteine mit Ähnlichkeit zu Src-Kinasen kodieren. Dabei handelt es sich um SmTK3 (Smp\_151300; Kapp et al., 2004), die Fyn-ähnliche SmTK5 (Smp\_136300; Kapp et al., 2001) und ein drittes Gen, für welches bislang keine Analysen existieren (Smp\_006920; Andrade et al., 2011; Protasio et al., 2012). Daneben wurde die Src-/Abl-Hybridkinase SmTK6 (Smp\_006920) beschrieben, deren Inhibition durch Herb A mittels GVBD-Experimente ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M bereits nachgewiesen wurde. Im Vergleich dazu inhibiert der Wirkstoff SmTK3 bereits ab 10 nM vollständig (Beckmann et al., 2011). Dementsprechend ist die verwendete Konzentration von 4,5  $\mu$ M zu gering ist um SmTK6 zu inhibieren, weshalb ein Einfluss der SmTK6 auf die morphologischen Veränderungen des Darms ausgeschlossen werden kann. In dieser Konzentration ist jedoch die Blockierung von SmTK3 gewährleistet, wobei dieses Molekül nicht in der Gastrodermis exprimiert wird (Kapp et al., 2004). Aus diesem Grund kann die Inhibition von SmTK3 bei der Ausprägung der veränderten Gastrodermis als gering angesehen werden. Die Transkription von SmTK5 wurde in Ovar, Vitellarium, Testes, sowie Parenchym, Subtegument und Gastrodermis beider Geschlechter adulter Schistosomen nachgewiesen (Knobloch et al., 2002a). Während der *in vitro* Kultivierung sind das Tegument und die Gastrodermis den Inhibitoren im Medium direkt ausgesetzt, wodurch dort die stärksten Effekte zu erwarten sind. Eine potentielle Inhibition von SmTK5 als u.a. gastrodermisassoziiertes Protein könnte somit auch zu den beschriebenen Effekten führen. Bislang wurde eine Inhibition von SmTK5 durch Herb A nicht überprüft, was aber aufgrund der Verwandtschaft zu SmTK3 als Src-Kinase denkbar ist und zukünftig überprüft werden sollte.

Eine weitere Möglichkeit zur Funktionsanalyse von Genen besteht in der Durchführung von RNAi-Versuchen (Hannon, 2002). Experimente mit SmTK3-spezifischen siRNAs zeigten jedoch keinen verlässlichen *knockdown* des Gens, was das Fehlen morphologischer Veränderungen bei diesen Würmern erklären kann (Daten nicht gezeigt). Versuche mit siRNAs gegen SmT $\beta$ RI allein oder in Kombination mit siRNAs gegen SmTK3

führten ebenfalls zu keinem stabilen *knockdown* und folglich zu keiner morphologischen Veränderung. Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass es Gene in *S. mansoni* gibt, deren Expression sich nicht durch RNAi posttranskriptionell supprimieren lässt, diese wurden als „non-knockables“ titulierte (Krautz-Peterson et al., 2010). Im Falle der RNAi-Versuche mit SmTK3- und SmTβRI-spezifischen siRNAs wäre die Wiederholung der Elektroporation mit zusätzlichem *soaking* (d. h. Inkubation der zuvor elektroporierter Würmer mit zugesetzten siRNAs *in vitro*) sinnvoll, da hierdurch eine effektivere Aufnahme der siRNAs möglich wäre (Ndegwa et al., 2007). Dieser modifizierte RNAi-Ansatz konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Um die Funktion von SmTK5 zukünftig zu bestimmen, könnten ebenfalls RNAi-Experimente durchgeführt werden. Im Falle eines stabilen *knockdowns* dieses Gens sollten morphologische Untersuchungen mögliche phänotypische Änderungen aufzeigen. Wenn es dabei zu einer ähnlichen morphologischen Veränderung wie nach der Herb A-induzierten Inhibierung kommt, wäre dies ein Hinweis auf die zusätzliche Inhibition der SmTK5 durch Herb A.

### 4.1.4 Differenziell transkribierte Gene nach erfolgten Inhibitorbehandlungen

Um Gene zu finden, die unter transkriptioneller Kontrolle eines Src-Kinasen-, bzw. TβRI-Signalwegs stehen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Bei der Datenanalyse standen Gene im Fokus, deren kodierte Proteine wichtige Funktionen während Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen besitzen. Unabhängig vom Einsatz je eines oder beider Inhibitoren konnte eine Vielzahl differenziell transkribierter Gene identifiziert werden (vgl. digitalen Anhang Tabellen 1, 5, 8), die zunächst in proteinkodierende Gene und putative *antisense*-RNAs bestimmter Genloci unterteilt wurden. Für die anschließenden Analysen wurden nur die proteinkodierenden Gene gewählt, die der Mehrheit entsprachen.

Im Vergleich der drei Inhibitorbehandlungen wurde die größte Anzahl differenziell transkribierter Gene nach Behandlung mit TRIKI gefunden (vgl. Abb. 3-9). Beim Einbau der Fluoreszenzstoffe während der *in vitro* Transkription (vgl. Kapitel 2.2.14.1) traten Probleme bei den Proben der Würmer der Herb A- bzw. Kombinationsbehandlung auf, weshalb jeweils ein technisches Replikat dieser Behandlungen nicht berücksichtigt wurde. Diese Farbstoffe lassen sich nicht gleichmäßig einbauen und fluoreszieren zudem unterschiedlich stark, sodass es zu Verschiebungen der Signifikanzen der Intensitätswerte kommen kann (Quackenbush, 2002). Dadurch können fälschlicherweise weniger Gene als „signifikant differenziell transkribiert“ identifiziert werden. Um eine vergleichbare Basis der Datenanalyse aller drei Microarray-Ansätze zu schaffen, wurde zusätzlich das Experiment mit der geringsten Totalintensität der TRIKI-Behandlung von der statistischen Auswertung

ausgeschlossen. Dennoch kann es zu einer stärkeren Verschiebung der Signifikanzverhältnisse bei den technisch problematischeren Experimenten mit Herb A allein oder in Kombination mit TRIKI und der daraus resultierenden geringeren Anzahl signifikant regulierter Genen kommen.

In der Analyse differentiell transkribierter Gene nach Behandlung mit TRIKI wurden viele Gene identifiziert, die für Signalproteine kodieren (vgl. digitalen Anhang, Tabelle 1). Zu diesen gehörten u.a. verschiedene Moleküle des schistosomalen TGF $\beta$ -Signalwegs. Die Typ I-Rezeptoren SmT $\beta$ RI (Smp\_049760) und SmBMPRI (Smp\_124450) zeigten eine signifikante Erhöhung der Transkription, die eine Art *feedback*-Regulation vermutet lässt. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine Erhöhung der Transkription von Sm14-3-3 $\epsilon$  (Smp\_034840.x; McGonigle et al., 2002), welches die TGF $\beta$ -induzierte Transkription erhöht (LoVerde et al., 2007). Daneben wurden weniger SmSmad2- (Smp\_085910) und SmSmad4- (Smp\_033950) Transkripte gefunden, wobei nur im Falle von SmSmad4 die Veränderung in der Regulation signifikant war. Diese Reduktion kann unter der Annahme einer *feedback*-Regulation durch die fehlende oder verringerte Phosphorylierung von Smad2 und anschließender Protein-Degradierung erklärt werden, ein Sachverhalt der als Konsequenz einer T $\beta$ RI-Inhibition bereits beschrieben wurde (Santibañez et al., 2011). Weiterhin lagen Transkriptmengen der TGF $\beta$ -Antagonisten Follistatin (Smp\_123300) und Noggin (Smp\_099440) erhöht vor, was die *feedback*-Regulationshypothese indirekt stützt, da beide in die Regulation von TGF $\beta$ -Signalwegen eingreifen (Moustakas & Heldin, 2009). Quantitative PCR-Analysen zur Validierung der Microarray-Ergebnisse zeigten für SmT $\beta$ RI und SmActRIIb (Smp\_144390) jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wurde für beide Methoden ermittelt (Myers & Well, 2003; Wu et al., 2004) und wies im Falle der TRIKI-Behandlung keine signifikante Korrelation auf. Schwankungen ermittelter Transkriptionsunterschiede im Vergleich von qPCRs und Microarray-Analysen sind jedoch nicht ungewöhnlich und resultieren vorwiegend aus den unterschiedlichen Normalisierungsprozessen beider Methoden (Morey et al., 2006). Einen kritischen Punkt stellt dabei die Datenfilterung der Microarray-Analyse dar. Wären stringenter Kriterien dieses Prozesses gewählt worden, so könnte eine signifikante Korrelation beider Methoden nach der TRIKI-Behandlung bestehen. Im Gegensatz dazu zeigten die Validierungen differentiell transkribierter Gene nach Herb A-, bzw. Kombinationsbehandlung signifikante Korrelationen der Ergebnisse der qPCR und Microarray-Analysen.

Wie nach der TRIKI-Behandlung zeigte sich auch nach Herb A-Behandlung, dass viele Gene, die für Signalmoleküle kodieren, differentiell transkribiert wurden (vgl. Tabelle 5, digitaler Anhang). Darunter befanden sich ebenfalls solche die am TGF $\beta$ -Signalweg beteiligt sind. SmActRII (Smp\_144390) sowie Sm14-3-3 $\epsilon$  (Smp\_034840.x; McGonigle et al., 2002) zeigten, wie nach Behandlung mit TRIKI, eine erhöhte Transkription, während SmSmad2

(Smp\_085910; nicht signifikant) und SmSmad4 (Smp\_033950; signifikant) transkriptionell verringert wurden. Diese gleichen Regulationsrichtungen von Genen des schistosomalen TGF $\beta$ -Signalwegs nach Behandlung mit TRIKI bzw. Herb A sprechen für die Hypothese kooperierender Signalwege von Src-TK und SmT $\beta$ RI (Knobloch et al., 2007). Diese Aussage wird auch durch die gleiche transkriptionelle Regulation von 87% der Gene in der Schnittmenge der Einzelbehandlungen gestützt (vgl. Abb. 3-9).

Neben der Transkription von Genen kodierend für Signaltransduktionsmoleküle wurde eine Vielzahl von *Heat shock protein*(Hsp)-Genen in ihrer Transkription durch Behandlung mit Herb A (einzeln oder in Kombination mit TRIKI) differentiell reguliert. Zu diesen zählte u.a. Hsp70 (Smp\_106930), welches in Datensätzen der Herb A- bzw. Kombinationsbehandlung als transkriptionell erhöht identifiziert wurde. Neben Src-Kinasen stellt das Chaperon Hsp90 ein potentielles Zielmolekül von Herb A dar (Blagosklonny, 2002). Daher stand die Transkriptionsregulation von Hsp-kodierenden Genen ebenfalls im Fokus dieser Transkriptomanalysen. Herb A kann direkt an Hsp90 binden, was eine veränderte Chaperonaktivität des Proteins zur Folge hat (Kasai & Kikuchi, 2010). Hierdurch kommt es zur Destabilisierung anderer Proteine, gefolgt von der Aktivierung der Transkription von Hsp70 und Hsp40 (Dinh et al., 2002). Diese Regulationsrichtung wurde für die Transkription von Hsp70 nach Behandlung mit Herb A bzw. Herb A kombinierte mit TRIKI auch für *S. mansoni* gezeigt. Das ist ein indirekter Hinweis auf die Möglichkeit einer zusätzlichen Inhibierung des schistosomalen Hsp90 durch Herb A.

Weiterhin wurden darmassoziierte Gene durch die Herb A- bzw. Kombinationsbehandlung im Microarray als signifikant regulierte Gene identifiziert. Diese Analyse war von besonderem Interesse, da bei entsprechender *in vitro* Behandlung eine stark veränderte, degradierte Gastrodermis beobachtet wurde (vgl. Kapitel 3.1.3). Die Einstufung als darmassoziierte Gene beruht auf einer Studie, in der durch *laser micro-dissection microscopy* transkriptionell erhöhte Gene der Gastrodermis im Vergleich zur Gesamt-RNA von Weibchen identifiziert wurden (Nawaratna et al., 2011). Dazu gehört z.B. ein Gen, welches für einen Vorläufer der Superoxiddismutase (Smp\_095980) kodiert, welches sowohl nach Einzel- als auch Kombinationsbehandlung mit Herb A transkriptionell reduziert wurde. Weitere darmassoziierte Gene sind Cathespin S (Smp\_139240) und Cathepsin D2-like (Smp\_136730), die nach TRIKI-Behandlung erhöhte Transkriptionen aufwiesen, im Gegensatz zum Cathepsin S-Gen, dessen Transkriptmenge bei simultaner Herb A/TRIKI-Behandlung reduziert war (vgl. Abb. 3-12). Nach Behandlungen adulter Würmer mit Herb A, bzw. der Kombination beider Inhibitoren über 5 Tage *in vitro* wurden eine verringerte Darmperistaltik sowie eine abnehmende Vitalität beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.3). Das steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer geschwächten Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese werden in der Regel durch Peroxiredoxine abgebaut (Henkle-Dührsen & Kampkötter, 2001). Das Genom von *S. mansoni* beinhaltet zwei Gene mit Ähnlichkeit zu diesen Molekülen



(Prx1: Smp\_059480 und Prx2: Smp\_158110), wobei diese stark in den Adultstadien transkribiert werden (Protasio et al., 2012). Nach Behandlung mit Herb A wurde eine signifikante Reduktion der Transkription von Prx2 in den Microarray-Daten identifiziert. Folglich ist es denkbar, dass ROS nicht mehr effektiv abgebaut werden und so zu einer Schädigung des Parasiten beitragen. Aufgrund der Signifikanzkriterien konnte keines der beiden Prx-Gene für die Kombinationsbehandlung als differentiell transkribiert gefunden werden. Im Vergleich dazu zeigten TRIKI-behandelte Würmer weder eine Veränderungen der Gastrodermis noch eine physiologische Beeinträchtigung der Darmperistaltik.

Als repräsentative oberflächenproteinkodierende Gene wurden drei verschiedene Tetraspaningene (Tetraspanin 18: Smp\_174190; Tetraspanin-1: Smp\_011560; Tetraspanin 1: Smp\_155310.1) in der qPCR auf transkriptionelle Änderungen untersucht. Von diesen war jeweils ein Gen pro Datensatz signifikant differentiell transkribiert (vgl. Abb. 3-10, Abb. 3-11, Abb. 3-12). In den qPCR-Analysen bestätigte sich die in den Microarrays gefundene transkriptionelle Reduktion aller drei Gene. In zusätzlichen qPCR-Analysen wurden diese drei Gene für alle Inhibitorbehandlungen untersucht, wobei deutliche Unterschiede der transkriptionellen Regulation sichtbar wurden (Daten nicht gezeigt). Während Tetraspanin 18 (Smp\_174190) durch alle drei Behandlungen eine verringerte Transkription aufwies, wurden große Schwankungen für Tetraspanin-1 (Smp\_011560) gefunden. Dieses Gen zeigte eine verringerte Transkription nach der Herb A-Behandlung, wurde durch TRIKI transkriptionell erhöht und bei Kombination beider Inhibitoren schwankte die Transkription in der qPCR in beide Regulationsrichtungen. Das dritte Gen, kodierend für Tetraspanin 1 (Smp\_155310.1), wurde für die Einzel- und Kombinationsbehandlung mit Herb A transkriptionell reduziert, durch Verwendung von TRIKI jedoch erhöht. Dennoch wurden durch diese Experimente eine deutliche Beeinflussung der Transkription von Tetraspanin-Genen in *S. mansoni* gezeigt, wodurch wahrscheinlich sowohl der TGF $\beta$ - als auch Src-TK vermittelte Signalweg an der Expression von Tetraspaninen beteiligt sind. Neben dem TGF $\beta$ -Signalweg regulieren EGFR-vermittelte Signalwege die Expression eines humanen Tetraspaningens (Kang et al., 2012). Für die Src-Kinase SmTK3 konnte in dieser Arbeit (vgl. Kapitel 3.2.1 und 3.2.1.2) eine Interaktion über das Molekül SmEps8 mit EGF-Rezeptoren (SER und SER2) gezeigt werden, so dass auch in *S. mansoni* eine Kooperation der TGF $\beta$ - und EGFR-Signalwege bei der Expression von Tetraspaningen denkbar ist. Um diese Hypothese zu bestätigen müssten zukünftig *in vitro* Experimente mit einem geeigneten EGFR-Inhibitor, z.B. dem EGFR Inhibitor (Millipore, Cat. No. 324674), durchgeführt und anschließend die Transkription der oben beschriebenen Tetraspaningene überprüft werden. Sollte sich deren Transkription ähnlich wie nach der Herb A-Behandlung verändern, so wäre dies ein weiterer Hinweis auf die Verbindung des EGFR- und Src-TK-vermittelten Signalwegs. Aufgrund der Filterung der Microarray-Daten lässt sich zusätzlich nicht ausschließen, dass auch noch weitere Tetraspanine durch die Inhibitoren in ihrer Transkription beeinflusst werden.

Ein Gen, dessen Transkription durch alle drei Inhibitorbehandlungen differentiell reguliert wurde, war Calmodulin-4 (Smp\_032990). Die Transkription dieses Gens wurde durch Behandlung mit TRIKI leicht reduziert, durch Herb A und die Kombinationsbehandlung erhöht, wobei eine stärkere Regulation bei Einzelbehandlung mit Herb A nachgewiesen wurde. Auch aus diesen Regulationstendenzen kann ein Zusammenwirken der Src- und T $\beta$ RI-Signalwege abgeleitet werden, da die Regulationsstärke der Kombinationsbehandlung eine Art Mittelwert der Stärken der Einzelbehandlungen repräsentierte. Dies stellt damit ein Beispiel für eine stärkere Wirkung von Herb A gegenüber TRIKI auf das Transkriptionsprofil eines Gens dar. Der Vergleich der Schnittmengen regulierter Gene der Einzel- mit der Kombinationsbehandlung zeigte ebenfalls einen stärkeren Einfluss der Herb A-Behandlung. So wurden bei Behandlung mit Herb A allein oder in Kombination mit TRIKI 72% der Gene in gleicher Richtung reguliert. Im Vergleich der TRIKI Einzel-, bzw. Kombinationsbehandlung zeigten nur 32% der Gene die gleiche Regulation.

Calmodulin ist ein Molekül mit vielfältigen Funktionen. Es kann direkt an Smad2 binden und dadurch dessen Signaltransduktion inhibieren, wobei gleichzeitig die Aktivität von Smad1 erhöht wird (Scherer & Graff, 2000). Daneben verläuft eine Vernetzung der Signalwege von Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin, RTK und der TGF $\beta$ -Familie über Calmodulin (Scherer & Graff, 2000). Eine weitere wichtige Funktion der Calmoduline und Calmodulin-Kinasen wurde für die Progression der Meiose von Oocyten beschrieben, wobei der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel wichtig ist (Lambert, 2011). Allgemein spielt Calmodulin und die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine wichtige Rolle für mitotische Prozesse (Whitaker & Larman, 2001). Dieser kann über Ryanodinrezeptoren (RYP) reguliert werden, welche bereits für *S. mansoni* beschrieben wurden (Smp\_163570; Silva et al., 1998). Dabei wurde gezeigt, dass RYP für die Ca<sup>2+</sup>-Homeostase in adulten Schistosomen verantwortlich ist. Die Funktion von Calmodulin-4 wurde jedoch für *S. mansoni* bislang nicht beschrieben und sollte Teil zukünftiger Untersuchungen sein, da dessen Transkriptionsregulation unter der Kontrolle der Src-Kinasen- und TGF $\beta$ -Signalwege steht. Für funktionelle Untersuchungen würde sich zunächst die Identifizierung putativer Interaktionspartner des Moleküls mittels Y2H-Screening anbieten, um Einblicke in die Signalwege von Calmodulin-4 zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit zur Funktionsuntersuchung von Calmodulin-4 wäre der Einsatz des W-7 Hydrochlorid Inhibitors (TOCRIS bioscience, Cat. No. 0369), wobei dieser alle Calmoduline inhibiert und nicht spezifisch ausschließlich Calmodulin-4. Eine spezifischere Inhibierung dieses Gens könnte durch posttranskriptionelle Suppression in Form von RNAi-Versuchen mit dsRNAs bzw. siRNAs gegen Calmodulin-4 durchgeführt werden. Im Anschluss an einen stabilen *knockdown* dieses Gens könnten morphologische Untersuchungen erfolgen, um Aufschluss über die Funktion dieses Gens zu erhalten.

#### 4.1.4.1 Vergleich differentiell transkribierter Gene nach Stimulation bzw. Inhibition des SmT $\beta$ RI

Eine aktuelle Transkriptomstudie beinhaltet die Identifizierung differentiell transkribierter Gene nach Stimulation adulter Schistosomen mit hTGF $\beta$  *in vitro*, wobei der gleiche Microarray wie in dieser Arbeit genutzt wurde (Oliveira et al., 2012). Dieser Ansatz ist invers komplementär zu der Untersuchung der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die TRIKI-Behandlung. Daher wurde ein Vergleich beider Studien durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.4.1.1). Für eine Schnittmenge von insgesamt 77 Genen wurden 75% und damit der Großteil der betroffenen Gene entgegengesetzt reguliert (vgl. digitaler Anhang, Tabelle 4). Die geringe Anzahl an Genen in der Schnittmenge kommt wahrscheinlich durch unterschiedliche Stringenzkriterien zustande. Für die Inhibitorstudien ( $q \leq 0,03$ ) wurde eine stringendere Signifikanz gewählt ( $q \leq 0,05$  bei den Stimulationsversuchen), dafür wurden nach Stimulation mit hTGF $\beta$  nur Gene mit einem log<sub>2</sub>Ratio-Wert von  $\geq 1$  als differentiell transkribiert betrachtet. Bei der Inhibitorstudie wurde dieses Kriterium nicht angewendet. Das stringente Signifikanzniveau der Inhibitorbehandlung ist von Vorteil, da unspezifische Wirkungen des Inhibitors auf andere Proteinkinasen möglich sind (vgl. Kapitel 4.1.1). Im Vergleich dazu kann eine spezifischere Wirkung durch hTGF $\beta$  erwartet werden, da bereits die Bindungskapazität des SmT $\beta$ RI für hTGF $\beta$  und hBMP7 untersucht wurde und nur ersteres den Rezeptor bindet (Beall & Pearce, 2001). Im Genom von *S. mansoni* wurden neben dem TGF $\beta$ -Rezeptor sowohl Activin- als auch BMP-Rezeptoren identifiziert (Protasio et al., 2012), von denen bislang jedoch keine Bindungsstudien mit hTGF $\beta$  existieren. Da jedoch neben den Rezeptoren auch die Liganden SmInAct (Smp\_063190) und SmBMP (Smp\_146790) in *S. mansoni* identifiziert wurden (Freitas et al., 2007; Freitas et al., 2009), liegt der Schluss nahe, dass eine spezifische Bindung der jeweiligen Cytokine an die entsprechenden Rezeptoren erfolgt. Unter Berücksichtigung dieser Vermutung wären die erhaltenen Transkriptionsregulationen nach Stimulation mit hTGF $\beta$  auf dessen Bindung an SmT $\beta$ RI zurückzuführen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass hTGF $\beta$  möglicherweise auch an Activin- oder BMP-Rezeptoren in Schistosomen bindet. Erste Hinweise auf eine unspezifische Bindung von hTGF $\beta$  an humane BMP-Rezeptoren wurden bereits erbracht (Mueller & Nickel, 2012). Um sicherzustellen, dass hTGF $\beta$  ausschließlich nur vom SmT $\beta$ RI gebunden wird, müssten daher zukünftig entsprechende Bindungsstudien für die schistosomalen Activin- und BMP-Rezeptoren durchgeführt werden.

Der Vergleich der Gene der Schnittmenge zeigte die erwartete meist konträre Regulation und nur zu 25% eine gleiche Transkriptionsänderung. Hauptunterschied beider Experimente ist die Hybridisierung von RNAs verschiedener Herkunft, d.h. Oliveira et al. (2012) verwendeten RNAs von Schistosomenpaaren, für die Microarrays der Inhibitorstudie der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich RNA von Schistosomenweibchen genutzt. Da der TGF $\beta$ -Signalweg möglicherweise unterschiedliche Funktionen in den Geschlechtern

besitzt, könnten Variabilitäten bezüglich der Transkriptionsregulationen einzelner Gene auftreten. Wenn die transkriptionellen Änderungen zusätzlich unterschiedlich stark sind, ist eine Verschiebung der Richtung der Transkriptionsregulation in der Microarray-Analyse möglich. Zum direkten Vergleich müssten exemplarisch ausgewählte Gene nach Geschlechtern getrennt validiert werden. In fünf Fällen der gleichen Regulationsrichtung wurden die entsprechenden Oligonukleotidsonden als putative *antisense*-Transkripte identifiziert. Aufgrund fehlender Informationen zu einer möglichen Funktion dieser *antisense*-RNAs kann keine Aussage über deren Regulation nach Behandlung mit hTGF $\beta$  getroffen werden. Daneben könnten durch technische Probleme wie Kreuzhybridisierungen „falsche“ Oligosonden gebunden werden, wodurch eine mögliche Fehldeutung des Fluoreszenzsignales zustande kommen würde. Eine weitere mögliche Ursache für diese gleichen Regulationstendenzen besteht in der statistisch berechneten Anzahl falsch positiver Gene in den entsprechenden Signifikanzniveaus. Zusammenfassend stützt die Tatsache, dass die Mehrzahl der Gene der Schnittmenge beider Analysen gegensätzlich reguliert vorlagen, indirekt die Ergebnisse der TRIKI-Behandlung. Überraschenderweise wurden nach Einsatz des Inhibitors mehr Gene transkriptionell erhöht und nach Stimulation mit hTGF $\beta$  verringert. Dieser Befund kann durch den reinen Vergleich der Gentranskription nicht erklärt werden, sondern müsste für ausgewählte Gene Bestandteile weiterführender, funktioneller Arbeiten sein.

#### **4.1.4.2 Differentielle Transkription verschiedener Eischalsynthesegene durch den Einfluss der Signalwege von SmT $\beta$ RI und Src-Tyrosinkinasen**

Trotz der beobachteten Unterschiede der Ovipositionsraten aus dieser und der vorangegangenen Arbeit (Knobloch et al., 2007) wurden Gene in den Microarray- und qPCR-Analysen als signifikant differentiell transkribiert gefunden, für die Funktionen bei der Eischalsynthese bereits bekannt (fs 800, Smp\_000270; p48, Smp\_014610; SmTyr1, Smp\_050270) oder vorhergesagt (*eggshell precursor protein*, Smp\_000430) waren. Daher stellte sich die Frage, ob die transkriptionelle Kontrolle über die Eischalsynthese zu den Zielprozessen gehört, die von beiden Signalwegen gesteuert werden. Um dies zu untersuchen, wurde die Transkription der oben genannten Gene sowie p14 (Smp\_131110.x) unter Inhibitoreinfluss durch zusätzliche qPCR-Analysen bestimmt. Das Eischalvorläufergen p14 ist das am stärksten transkribierte Gen in Schistosomenweibchen (Chen et al., 1992; Kunz et al., 1995) und seine Expression im Vitellarium wurde über *in situ*-Hybridisierungen und Immunlokalisationen bestätigt (Köster et al., 1988). Daneben ist es der Hauptbestandteil der Eischale (deWalick et al., 2011).

Ein Vergleich der verschiedenen Inhibitorbehandlungen zeigte eine tendenziell leicht erhöhte Transkription aller Gene nach TRIKI-Behandlung. Eine sehr stark verringerte

Transkription der Gene wurde hingegen nach Behandlung mit Herb A gefunden. Bei Kombination beider Substanzen verringerte sich ebenfalls die Transkription, jedoch moderater als bei der Herb A-Einzelbehandlung.

Bei Behandlung mit TRIKI fanden Knobloch et al. (2007) die geringste Reduktion der Eiproduktion. Auf den ersten Blick erklärt das jedoch nicht die erhöhte Transkription der oben genannten Gene. Dieses Ergebnis implizierte vielmehr einen negativen Einfluss des TGF $\beta$ -Signalwegs auf die Eiproduktion. Die nach der TRIKI-Behandlung erhöhte Transkription des fs800-ähnlichen Gens wird durch den Vergleich mit der Transkriptomstudie von Oliveira et al. (2012) zusätzlich gestützt, da in dieser entgegengesetzten Studie eine reduzierte Transkription für dieses Gen identifiziert wurde (vgl. digitaler Anhang, Tabelle 4). Der Prozess der Eischalsynthese ist allerdings sehr komplex und wird durch eine Vielzahl an Genen reguliert, welche im Rahmen dieser Analyse wahrscheinlich unerkannt blieben, aber dennoch eine mögliche negative Regulationsrichtung nach Behandlung mit TRIKI aufwiesen. Diese Erklärung ist denkbar, da nur exemplarisch bereits charakterisierte Gene, mit Ausnahme des *eggshell precursor proteins*, für die qPCR-Analysen ausgewählt wurden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden mittels SAGE-Analysen Gene identifiziert, die exklusiv in Weibchen aus bi- bzw. unisexuellen Infektionen transkribiert werden und damit auch eine mögliche Rolle bei der Eiproduktion spielen (Cogswell et al., 2012). Zusätzlich wurden Lokalisationen dieser Gene durch *whole mount in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Eines dieser Gene zeigte Übereinstimmungen zu einem *brain-specific membrane-anchored protein* (Smp\_074000), welches in Vitellocyten des Vitellariums und des Vitellocyten lokalisiert wurde. Für dieses Molekül wurde eine Funktion während der Synthese von Eiern und der Aufrechterhaltung maturer Vitellocyten postuliert (Cogswell et al., 2012). Durch Behandlung mit TRIKI wurde dieses Gen transkriptionell verringert und zählt möglicherweise zu den Genen, die zu einer verringerten Eizahl nach dieser Behandlung führten.

Im Vergleich zu den TRIKI-Daten zeigten die ausgewählten Gene eine starke Transkriptionsreduktion nach Behandlung mit Herb A. Dieses Ergebnis korreliert mit der starken Reduktion der *in vitro* Eiproduktion unter Einfluss dieses Inhibitors (Knobloch et al., 2006). Neben diesem Ergebnis wurde ein weiterer Hinweis für den Einfluss von Src-Kinasen auf die Eiproduktion in weiteren detaillierten Analysen der differentiell transkribierten Gene im Microarray entdeckt. In einer veröffentlichten Studie wurde eine direkte Verbindung der Eiproduktion und des mitochondrialen Sauerstoffverbrauch vorgestellt (Huang et al., 2012). Während dieses Prozesses ist die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren ein essentieller Schritt, welcher zunächst in den Mitochondrien durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert wird. Nach Behandlung der Schistosomen mit Herb A wurde eine reduzierte Transkription des Gens der Acyl-CoA-Dehydrogenase (Smp\_122930) im Microarray identifiziert. Damit sind verschiedene Moleküle des Prozesses der Eiproduktion direkt durch die Behandlung mit

Herb A betroffen, wodurch die Hypothese des Einfluss von Src-Kinasen auf den komplexen Prozess der Eiproduktion zusätzlich unterstützt wird.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen verringerten Transkriptionsraten des Gens p14 stehen im Widerspruch zu einer in vorherigen Northern Blot-Analysen ermittelten erhöhten Transkription nach Herb A-Einfluss (Knobloch et al., 2006). Ein Grund hierfür könnten die biologische Varianz sowie unterschiedliche Kultivierungsbedingungen sein, die, wie bereits beschrieben, einen sehr starken Einfluss auf die Oviposition besitzt. Allerdings zeigten alle im Microarray und der qPCR untersuchten Gene, deren Proteine für die Eischalsynthese und damit für die Eiproduktion wichtig sind, eine reduzierte Transkription nach Herb A-Behandlung, wonach sich diese Ergebnisse gegenseitig stützen.

Auch die Kombinationsbehandlung beider Inhibitoren führte zu einer reduzierten Transkriptionsrate der untersuchten Gene, wenn auch nicht so stark wie die der Herb A Einzelbehandlung. Dieses Ergebnis war überraschend, da die stärksten Effekte auf die Eiproduktion *in vitro* bei dieser Behandlung gefunden wurden (Knobloch et al., 2007). Ähnlich wie bei Calmodulin-4 (Smp\_032990) scheinen die Transkriptlevel dieser Gene eine Art Mittelwert der Level nach den Einzelbehandlungen zu sein. Dementsprechend würden Src-TK-Signalwege einen stärkeren Einfluss auf Prozesse zur Eiproduktion ausüben als der SmTβRI-Signalweg. Dies kann auf den bereits erwähnten zusätzlichen Einfluss der Src-TKs auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zurückzuführen sein. Insgesamt bestätigen aber auch die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen eine Kooperation beider Signalwege.

### 4.1.5 Ausblick

Zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen der Src-TKs von *S. mansoni* könnte die Charakterisierung des proteinkodierenden Gens der dritten Src-Kinase (Smp\_006920; Andrade et al., 2011; Protasio et al., 2012) beitragen. Dafür ist die Aufklärung des Transkriptionsprofils in Form von RT-PCRs mit RNA verschiedener Stadien des Lebenszyklus sowie *in situ*-Hybridisierungen für Lokalisationen geeignet. Für dieses wie auch für SmTK5 wäre die Untersuchung des möglichen Einfluss von Herb A auf die Aktivität dieser Kinase im *Xenopus*-Oocyten-System von Interesse.

Im Rahmen der Microarray-Analysen waren neben Transkripten proteinkodierender Gene auch putative *antisense*-Transkripte differentiell reguliert. Diese gehören zu den nicht-kodierenden RNAs (*non-coding*; ncRNAs), welche beispielsweise in Eukaryoten die Expression von Genen regulieren (Barrett et al., 2012). In *S. mansoni* wurden bereits Hinweise für die Existenz von *antisense*-RNAs erbracht, wobei mehr als 10% des Genoms ncRNAs darstellen (Verjovski-Almeida et al., 2007; Oliveira et al., 2011). Ist es zukünftig interessant die putative Funktion und Rolle im TGFβ- und Src-TK-Signalweg für die differentiell transkribierten

ncRNAs der vorliegenden Arbeit zu bestimmen. Zunächst sollte jedoch verifiziert werden, dass es sich um ncRNAs handelt, wobei dies über Amplifikation der Volllänge der ncRNA erfolgt (Forrest et al., 2009).

### 4.2 Untersuchung ausgewählter Signalkaskaden in Reproduktionsorganen

Für die Aufklärung von Signaltransduktionsprozessen zellulärer Tyrosinkinasen in *S. mansoni* wurden Y2/3H-Arbeiten erfolgreich eingesetzt (Knobloch et al., 2007; Quack et al., 2009; Beckmann et al., 2010a). Diese Arbeiten beruhten zum Teil auf Literaturhinweisen bekannter Interaktionen anderer Organismen und der anschließenden Identifizierung von Schistosomenproteinen mit Übereinstimmungen zu den entsprechenden Signalmolekülen. Daneben können unbekannte Interaktionspartner mit Hilfe einer Hefe-basierten cDNA-Bank durch sogenannte Y2/3H-Screenings identifiziert werden (Fields & Sternglanz, 1994; BioTeach, 2008; Quack et al., 2009). Allerdings zeigt diese Methode einige Limitierungen, wobei eine eingeschränkte oder fehlende posttranslationale Modifikation von Proteinen, wie eine zielgerichtete Tyrosinphosphorylierung, einen bedeutenden Einfluss auf Protein-Interaktionen von Eukaryoten besitzt (Brückner et al., 2009). Für das *upstream* Screening der Src-Kinase SmTK3 (vgl. Kapitel 3.2.1) wurde die SH2-Domäne verwendet, welche an phosphorylierte Tyrosine bindet (Thomas & Brugge 1997; Boggon & Eck, 2004). Da Hefen jedoch keine spezifische endogene Tyrosinkinaseaktivität besitzen (Ptacek et al., 2005), wurde die TK-Domäne der SmTK5 co-exprimiert. Diese Vorgehensweise konnte bereits im Vorfeld erfolgreich angewendet werden, um spezifische Interaktionen zu verstärken bzw. überhaupt zu ermöglichen (Osborne et al., 1995; Wang et al., 2001; Beckmann et al., 2010b). Durch die Expression der TK-Domäne wird die Phosphorylierung von Tyrosinresten verschiedener Proteine, zu denen auch putative Interaktionspartner gehören, gewährleistet. Ein weiterer kritischer Aspekt von Y2H-Experimenten ist die teilweise schwache oder gegebenenfalls sogar ausbleibende Detektion transienter Interaktionen, wozu beispielsweise Interaktionen von Signalproteinen gehören (Van Crielinge & Beyaert, 1999). Dennoch zeigten ältere Arbeiten bereits, dass diese Methode für *S. mansoni* geeignet ist (Quack et al., 2009; Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2011). Daher diene sie auch in dieser Arbeit der weiteren Charakterisierung von Signalwegen. Zur Verifikation identifizierter Interaktionen wurden zusätzliche Experimente, wie beispielsweise *in situ*-Hybridisierungen zur Bestimmung der Expressionsorte von Interaktionspartnern durchgeführt.

#### 4.2.1 Identifikation und Charakterisierung von SmEps8 als *upstream* Interaktionspartner der Src-Kinase SmTK3

Für die weitere Aufklärung der Signalkaskade von SmTK3 in *S. mansoni* führte Dr. Cora Burmeister (AG Grevelding) ein Y3H-Screening durch (Buro et al., in Vorbereitung). Als häufigster und zugleich stärkster Interaktionspartner wurde ein Vertreter der EGFR *pathway substrate* 8-Familie identifiziert, SmEps8 (Smp\_139520). Durch die Anwendung von BlastX- und SMART-Analysen wurde dieses Molekül strukturell charakterisiert, in konservierte Bereiche unterteilt und entspricht dem typischen Aufbau der Eps8-Proteinfamilie (Di Fiore &



Scita, 2002). Allerdings fielen bei der Identifizierung der konservierten Domänen Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen von Eps8-Molekülen der Vertebraten und der Invertebraten auf. Dieses Phänomen wurde bereits von Tocchetti et al. (2003) beschrieben, wobei die Aminosäuresequenzen verschiedener Eps8-Moleküle miteinander verglichen und eine hohe Konservierung zwischen den Molekülen des Menschen und der Maus gefunden wurde. Im Gegensatz dazu zeigten Vergleiche der Eps8-Moleküle der Invertebraten nur in einzelnen Bereichen eine Konservierung. Wie in der Abbildung 3-14 zu sehen, wurde auch für SmEps8 eine stärkere Konservierung zu den Invertebraten-Molekülen gefunden, als zu denen der Vertebraten. Eine hohe Sequenzübereinstimmung der Eps8-Gene wurde beim Vergleich dieser Moleküle innerhalb der Trematoden identifiziert. Jedoch auch innerhalb der Trematoden zeigte sich eine Unterscheidung zwischen Eps8-Molekülen aus *C. sinensis* und den Schistosomatidae. Ähnliche Ergebnisse lieferten bereits frühere phylogenetische Untersuchungen anderer Moleküle von *S. mansoni*. So wurde für die Syk-Tyrosinkinase SmTK4 eine deutliche phylogenetische Trennung dieser Moleküle zwischen Vertretern der Vertebraten und der Invertebraten gezeigt (Knobloch et al., 2002a). Diese Trennung wurde ebenso bei  $\alpha$ -/ $\beta$ -Integrinen verschiedener Organismen entdeckt (Beckmann et al. 2012b).

#### 4.2.1.1 Charakterisierung der SmTK3-SmEps8-Interaktion

Die Interaktion von Eps8 und v-Src ist bereits aus Untersuchungen humaner Zelllinien bekannt und spielt eine wichtige Rolle bei der Actin-Remodellierung während Zellproliferations- und Differenzierungsprozessen (Gallo et al., 1997). Weiterhin beinhaltet Eps8 aufgrund seiner konservierten Domänen potentielle Bindungsstellen für verschiedene Proteine, was auf diverse Signaltransduktionsfunktionen hindeutet (Provenzano et al., 1998). Dementsprechend stellte die Identifizierung dieses Proteins als interessanter *upstream* Interaktionspartner von SmTK3 (Smp\_151300) einen wichtigen Ansatzpunkt für die weitere Aufklärung des Signalwegs dieser Tyrosinkinase dar. Dennoch war dieses Ergebnis unerwartet, da bereits im Vorfeld ein ähnlicher Ansatz genutzt wurde, um die Signalkaskade von SmTK3 weiter aufzuklären (Philipp, 2004). Für das damalige Y3H-Screening wurde ebenfalls die SH2-Domäne von SmTK3 als *bait*-Protein verwendet, jedoch die TK-Domäne der SmTK3 statt der SmTK5 co-exprimiert. Als Interaktionspartner wurden dabei ein Zinkfingerprotein (SmZF1), eine Topoisomerase III und ein translokationsassoziiertes Membranprotein 1 (TRAM1) gefunden, allerdings kein Protein mit Ähnlichkeit zu Eps8. In dem neueren Y3H-Screening wurden mit Ausnahme von vier *prey*-Klonen ausschließlich SmEps8 identifiziert. Diese Ergebnisse weisen auf einen Einfluss der verschiedenen co-exprimierten TK-Domänen für die Identifikation von Interaktionspartnern der SmTK3SH2. Eine Erklärung für diesen Einfluss auf die unterschiedlichen Interaktionen besteht

möglicherweise in der Aktivität der Tyrosinkinase-Domänen. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Colette Dissous (CIIL – Center for Infection and Immunity der Universität Lille, Frankreich) gezeigt, dass die katalytische Aktivität der TK-Domäne der SmTK5 stärker ist als die der SmTK3 (persönliche Mitteilung). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den beiden Screenings bestand in einem in neueren Sequenzierungsdaten gefundenen *frame shifts* innerhalb der damals verwendeten SmTK3TK (Philipp, 2004). Durch diese Verschiebung war der ORF bereits nach wenigen Aminosäuren unterbrochen, wodurch nur einige Aminosäuren der TK-Domäne exprimiert wurden. Eine mögliche Konsequenz dieser partiellen Expression der SmTK3TK könnte eine fehlerhafte Faltung des Proteins sein, die zu anderen Bedingungen für Protein-Protein-Interaktionen in den Hefezellen führte, als dies bei Expression der vollständigen SmTK3TK, bzw. ohne zusätzliche Expression dieser Domäne möglich gewesen wäre. Ein solches Screening wurde in dieser Arbeit für diese Interaktion nicht durchgeführt, stattdessen aber die direkte Interaktion und deren relative Bindungsstärke von SmTK3SH2 mit SmEps8 untersucht (vgl. Abb. 3-16). Dabei konnte die stärkste Bindung zwischen beiden Molekülen ohne zusätzliche Expression der SmTK5TK detektiert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass diese Protein-Protein-Interaktion auch unabhängig vom Phosphorylierungsgrad der Tyrosine stattfinden kann. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch mit dem Ergebnis des Screenings, da dieses ausschließlich mit zusätzlich exprimierter SmTK5TK durchgeführt wurde und entsprechend keine Hinweise auf weitere Interaktionspartner geben kann. Ungewöhnlich war diese phosphorylierungsunabhängige Interaktion insbesondere deshalb, weil klassische Interaktionen von SH2-Domänen für Bereiche von Molekülen mit phosphorylierten Tyrosinresten beschrieben wurden (Wandless, 1996). Neuere Studien erweiterten das Bild der möglichen Interaktionen von SH2-Domänen. Dai et al. (2011) identifizierten eine Interaktion der SH2-Domäne des Proteins Tensin 2, unabhängig von der Phosphorylierung. Ebenso konnte bereits das Consensus-Motiv der SH2-Domäne für eine phosphorylierungsunabhängige Interaktionen beschrieben werden (Hwang et al., 2002). Die ermittelte Sequenzabfolge bestand aus den Aminosäuren T/SxxxxV/I (x repräsentiert eine beliebige AS) und weicht damit deutlich von dem klassischen Bindemotiv ab (beinhaltet die Aminosäuren YEEI; Songyang et al., 1993). Bei der Untersuchung der SmEps8-Sequenz wurde der putative Consensus von Hwang et al. (2002) in der Sequenz des verkürzten Klon und der Vollständigkeitsvariante identifiziert, das klassische Bindemotiv (YEEI) jedoch nicht. Die dargestellten Auswertungen der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filter- und Flüssigassays sowie der Bindemotivuntersuchungen legen den Schluss nahe, dass die Interaktion von SmTK3 und SmEps8 nicht vom Phosphorylierungsgrad der Tyrosinreste abhängt.

Neben dem Einfluss der zusätzlich exprimierten TK-Domäne von SmTK5 auf die relativen Bindungsstärken von SmTK3 und SmEps8 stand die detaillierte Untersuchung des für die Interaktion notwendigen Bereichs der SmTK3 im Fokus der durchgeführten

Experimente. In dem verwendeten Hefesystem konnte die Interaktion im Bereich der SH2-Domäne der SmTK3 und der PTB sowie dem Zwischenbereich zur EGFR-BD von SmEps8 lokalisiert werden. Durch zusätzliche Expression der SH3-Domäne von SmTK3 ließ sich keine Verstärkung der Interaktion beobachten. Bei ausschließlicher Expression der SH3-Domäne wurde die geringste Bindungspotenz beider Proteine registriert (vgl. Abb. 3-16). Dieses Ergebnis widerspricht dem Befund einer älteren Studie, in der anhand von Co-Immuno-präzipitationen mit murinen Proteinen eine *in vivo* Bindung von Eps8 und der SH3-Domäne der v-Src gefunden wurde (Maa et al., 1999). Bei beiden Arbeiten handelte es sich um sehr unterschiedliche Methoden, weshalb die Ergebnisse beider Studien nur schwer vergleichbar sind. Eine Co-Immunopräzipitation wurde für die schistosomalen Proteine nicht durchgeführt, müsste jedoch für einen direkten Vergleich beider Studien herangezogen werden. Weiterhin wäre es denkbar, dass je nach Organismus (Vertreter der Vertebraten bzw. Invertebraten) ein unterschiedlicher Bereich der Src-Kinase für die Interaktion mit Eps8 notwendig ist. Diese Erklärung könnte auf einen Zusammenhang der klaren Trennung der phylogenetischen Beziehungen von Eps8-Molekülen der Vertebraten und Invertebraten hindeuten. Unabhängig von dem Bereich der Src-Kinase wurde in beiden Studien der für die Interaktion wichtige Bereich des Eps8-Moleküls auf dem N-Terminus lokalisiert.

Mit Hilfe der Y3H-Experimente konnte eine weitere wichtige Aussage über die relativen Bindungsstärken der Interaktion von SmTK3 und SmEps8 getroffen werden. Dabei wurde der Einfluss von SmEps8 auf die Interaktion untersucht, d.h. neben der N-terminal verkürzten Variante des Proteins wurde auch die Vollängenvariante für die Interaktionsanalyse mit SmTK3 verwendet (vgl. Abb. 3-16). Die Ergebnisse der  $\beta$ -Gal Flüssigassays zeigten, dass bei Verwendung der verkürzten Variante die Interaktionen mit den verschiedenen SmTK3-Konstrukten deutlich stärker waren, als die der Vollängenvariante von SmEps8. Ein ähnliches Resultat wurde bereits in einer anderen Studie für die Bindung von murinen Eps8 an F-Actin gefunden (Disanza et al., 2004). Dabei wurde eine starke Interaktion der isolierten Effektdomäne von Eps8 mit F-Actin detektiert, die Vollängenvariante von Eps8 besaß jedoch keine Affinität zu diesem Molekül. Erst die zusätzliche Interaktion der Vollängenvariante von Eps8 mit Abi-1 führte zu einer Interaktion des Moleküls mit F-Actin. Der mit Abi-1 interagierende Bereich des Eps8-Moleküls entspricht der SH3-Domäne, wie Bindungsstudien in humanen Fibroblastenzellen zeigten (Biesova et al., 1997). Als Erklärung für die veränderte Affinität zu F-Actin, hervorgerufen durch die zusätzliche Expression von Abi-1, postulierten Disanza et al. (2004) eine SH3-Domäne vermittelte Autoinhibierung des Eps8-Moleküls. Eine ähnlich negative Beeinflussung der Interaktionsstärke wurde auch für SmTK3 und SmEps8 gefunden, jedoch konnte die Interaktion beider Moleküle durch Verwendung der Vollängenvariante von SmEps8 nicht vollständig unterbunden werden. Da die Vollängenvariante neben der SH3-Domäne auch die EGFR-BD und die SAM-PNT-Domäne enthielt, wäre eine Beeinflussung der Aktivität des

Moleküls durch diese Domänen ebenfalls denkbar. Um einen möglichen Einfluss der SH3-Domäne auf SmEps8 zu untersuchen, wurde ein Y2H-Versuch mit einem schistosomalen Protein mit Ähnlichkeit zu Abi-2 (SmAbi-2, Smp\_085740) durchgeführt (vgl. Abb. 3-20). Allerdings konnte bei diesem Experiment keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt sich durch das bevorzugte Bindemotiv der Eps8-spezifischen SH3-Domäne erklären, welches von dem anderer SH3-Domänen abweicht. Allgemein besteht das Bindemotiv von SH3-Domänen aus den Aminosäuren PxxP (Thomas & Brugge, 1997). Mongioví et al. (1999) identifizierten den Eps8-spezifischen Consensus mit der Sequenz PxxDY, wobei die Aminosäuren Aspartat (D) und Tyrosin (Y) essentiell für diese Protein-Protein-Bindung sind. Bei genauerer Untersuchung der Aminosäuresequenz von SmAbi-2 konnte diese Consensus-Sequenz nicht gefunden werden, was die Bindung zu SmEps8 wahrscheinlich verhinderte. Neben der SH3-Domäne könnte auch die SAM-PNT-Domäne der Vollängenvariante von SmEps8 die relativen Interaktionsstärken der Bindungen mit SmTK3 beeinflussen. Funktionelle Studien für diesen Bereich sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Die  $\beta$ -Gal Flüssigassays zeigten deutliche Ergebnisse unabhängig von der Interaktionsuntersuchung mit SmAbi-2 und der putativen Interaktion mit F-Actin über die SAM-PNT-Domäne. Mit Hilfe dieser Assays konnte gezeigt werden, dass die Länge von SmEps8 einen deutlich Einfluss auf die Interaktion mit SmTK3 besitzt. *In situ*-Hybridisierungen zeigten eine Kolo-kalisierung der Transkripte der Gene SmTK3 und SmEps8 in den Reproduktionsorganen (Kapp et al., 2004; Buro et al., in Vorbereitung). Darüber hinaus wurde die Transkription beider Gene in adulten Schistosomen durch RT-PCR nachgewiesen (vgl. Abb. 3-17; Kapp et al., 2004). Die Ergebnisse untermauern die Hinweise auf eine mögliche Interaktion beider Moleküle *in vivo*. Diese scheint nur in den Adultstadien von Bedeutung, da nur hier Transkriptionen beider Gene über RT-PCRs gefunden wurden.

### 4.2.2 Verbindung der SmTK3-Signalkaskade mit der EGFR-Transduktion

Im Anschluss einer *in vivo* EGF-Stimulation von humanen EGFRs wurde eine Phosphorylierung von Eps8 ermittelt und dieses Protein als ein Substrat der EGFRs beschrieben (Fazioli et al., 1993). Die Interaktion beider Moleküle erfolgte dabei unabhängig vom Phosphorylierungsgrad über den N-terminalen Bereich von Eps8. Mit Hilfe von Immunopräzipitationen wurde diese Interaktion näher untersucht (Castagnino et al., 1995). Der für die Interaktion wichtige Bereich des EGFRs befand sich im Juxtamembran-Bereich, d.h. der Bereich zwischen der Transmembran- und TK-Domäne, und beinhaltete eine glutaminreiche Sequenz. Diese Sequenz des EGFRs wurde durch die EGFR-BD von Eps8 erkannt. Ein EGFR-Molekül von *S. mansoni* wurde bereits intensiv untersucht (Smp\_093930.x; Shoemaker et al., 1992). Dabei handelte es sich um SER, der sowohl in den Adultstadien als auch in den Cercarien exprimiert wurde und eine muskelspezifische

Lokalisierung zeigte (Ramachandran et al., 1996). Des Weiteren konnte mittels funktioneller Studien für SER sowohl eine katalytisch aktive TK-Domäne (Ramachandran et al., 1996) als auch die Ligandenbindung von humanen EGF bestimmt werden, dabei wurde SER in *X. laevis* Oocyten exprimiert und nach Stimulation mit dem Liganden ein GVBD beobachtet (Vicogne et al., 2004). In Folge einer *in vitro* Kultivierung von Sporocysten als auch adulten Schistosomen mit Zusatz von EGF wurden zusätzlich ein Anstieg der DNA- und Proteinsynthese ermittelt (Vicogne et al., 2004). Neben SER wurden zwei weitere Moleküle mit Ähnlichkeit zu EGFRs für *S. mansoni* im Genom beschrieben (SER2: Smp\_165470; SER3: Smp\_152680; Andrade et al., 2011), für die bislang jedoch keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden. Durch Sequenzanalysen konnten innerhalb der drei identifizierten EGFRs ebenfalls die für die Interaktion mit Eps8 wichtigen Glutamine (Glu) gefunden werden (SER: 6x Glu; SER2: Smp\_165470: 1x Glu; SER3: Smp\_152680: 10x Glu; vgl. Anhang 0) sowie die Kernelemente der EGFR-BD in SmEps8 (Castagnino et al., 1995). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden erste Y2H-Experimente zur Überprüfung der Interaktion der drei SERs und SmEps8 durchgeführt (vgl. Abb. 3-19, B). Dabei zeigten die Interaktionen generell nur sehr schwache, aber dennoch positive Signale für die Bindung von SmEps8 mit den intrazellulären Bereichen von SER bzw. SER2. Die beobachteten Interaktionssignale könnten durch eine fehlerhafte Faltung der EGFR-Proteine begründet sein, welche durch die Subklonierung der intrazellulären Bereiche der Rezeptoren zustande kommen könnten. Um diese fehlerhafte Faltung zu umgehen, müssten Interaktionsstudien der Vollängensequenzen in einem anderen System für Membranproteine überprüft werden. Darüber hinaus könnte die nukleusassoziierte Interaktion zu einer Abschwächung der Bindung der SERs und SmEps8 geführt haben (Brückner et al., 2009). Dennoch konnten erste Hinweise auf die Interaktion von SmEps8 mit den intrazellulären Bereichen zweier EGFR-Moleküle von *S. mansoni* gefunden werden. Die klonierten Einzelbereiche des dritten EGFRs (SER3) führten in keinem Fall zu einer messbaren Interaktion. Für diese Subfragmente trifft wahrscheinlich ebenfalls eine fehlerhafte Proteinfaltung zu, aus der die fehlende Interaktion resultierte.

Mit Hilfe der gefundenen Interaktionen von SmEps8 mit den EGFRs und der SmTK3 konnte erstmalig eine Verknüpfung der Signalwege der Src-Kinase und membranverankerten RTKs des EGFR-Typs für *S. mansoni* identifiziert werden. Aufgrund neuerer *in situ*-Hybridisierungsdaten kolokalisieren die Moleküle SmEps8 und SER in den weiblichen Reproduktionsorganen, Ovar und Vitellarium (Buro et al., in Vorbereitung), in denen auch Transkripte von SmTK3 detektiert wurden (Kapp et al., 2004). Eine mögliche Signalkaskade dieser Moleküle könnte bei der Bindung von humanem EGF beginnen, das durch SER gebunden wird. EGF-Bindungsstudien mit SER2 wurden bislang nicht durchgeführt. Auch dieser EGFR besitzt eine Ligandenbindedomäne im extrazellulären Bereich und in einem Alignment beider Rezeptoren wurde eine 27% ige Sequenzübereinstimmung festgestellt

(Daten nicht gezeigt). Möglicherweise kommt es nach Bindung des humanen EGFs an SER zur Dimersierung beider Rezeptoren mit anschließender Autophosphorylierung. Das Signal der ligandengebundenen EGFRs könnte an SmEps8, und über dieses Molekül wiederum an SmTK3 weitergeleitet werden. Wie bereits von Vicogne et al. (2004) beschrieben, erfolgt nach der EGF-Bindung ein Anstieg der DNA-Synthese von Sporocysten und adulten Schistosomen *in vitro*. Dieses Ergebnis kann durch die Signalweiterleitung über die Src-Kinase SmTK3 erklärt werden, da bei Verwendung eines Src-Kinasen Inhibitors (Herb A) eine verringerte mitotische Aktivität in den behandelten Weibchen gemessen wurde (Knobloch et al., 2007). Durch die Verbindung der Signalwege von SER und SmTK3 könnte der EGF-induzierte Anstieg der DNA-Synthese direkt durch SmTK3 vermittelt werden. Um den Einfluss anderer Src-Kinasen wie SmTK5 (Smp\_136300) oder der dritten Src-Kinase von *S. mansoni* (Smp\_006920; Andrade et al., 2011; Protasio et al., 2012) bei dieser Interaktion auszuschließen, müssten entsprechende Interaktionsstudien dieser Kinasen mit SmEps8 durchgeführt werden. Neben der Bindung von humanen EGF wäre die Bindung eines parasitenspezifischen EGFs denkbar, wobei dieses bislang nicht im Genom von *S. mansoni* identifiziert werden konnte.

### 4.2.3 Zukünftige Experimente für die Aufklärung der Funktion von SmEps8

Wichtiger Bestandteil zukünftiger Arbeiten an SmEps8 sollten verschiedene Interaktionsstudien sein, die durch Co-Immunopräzipitationen verifiziert werden müssten. Eine interessante Interaktionsstudie könnte mit einem Proteinhomolog zum Signalmolekül *Son of sevenless-1* (Sos-1) durchgeführt werden. Bei Untersuchungen in muriner Zellkultur wurden Interaktionen der SH3-Domäne von Eps8 mit Abi-1 identifiziert, welches wiederum über seine SH3-Domäne an Sos-1 bindet (Scita et al., 2001). Nach Ausbildung dieses Komplexes, kommt es mit geringer Affinität zu einer direkten Interaktion von Eps8 und Sos-1. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Hinweis auf eine SmEps8-SmAbi-2-Interaktion gefunden werden, was wahrscheinlich auf das fehlende Consensus-Motiv der SH3-Domäne von SmEps8 in SmAbi-2 zurück zu führen ist (vgl. Kapitel 4.2.1.1). Allerdings existiert laut Datenbankanalysen ein Protein mit Sequenzübereinstimmung zu Sos-1 in *S. mansoni* (Smp\_161230). Im Falle einer Bindung von SmEps8 an SmSos-1 wäre als nächster Schritt die Untersuchung der Interaktion von SmAbi-2 und SmSos-1 sinnvoll. Der trimere Eps8-Abi-1-Sos-1-Komplex reguliert im humanen System die Guanin-Austauschaktivität von Rac/Ras, wobei Sos-1 die katalytische Untereinheit bildet (Scita et al., 2001). Durch die Aktivierung von Rac wird die Actinpolymerisierung induziert, was für mitotische Prozesse eine wichtige Rolle spielt. Um einen Einfluss von SmEps8 auf das Cytoskelett zu untersuchen, sollte eine putative Interaktion mit F-Actin im Fokus stehen, welche aus Studien von *C. elegans* bereits bekannt ist (Croce et al., 2004). Für diese Versuche sollte ein möglicher Einfluss der

Moleküllänge von SmEps8 berücksichtigt werden, da das murine Eps8-Volllängenmolekül eine geringe Affinität zu F-Actin aufgrund der SH3-vermittelte Autoinhibierung besaß (Disanza et al., 2004).

Ferner könnten RNAi-Versuche mit anschließender Phänotypenanalyse über u.a. KLSM weitere Aufschlüsse zur Funktion dieses Moleküls bringen. Ein solcher Versuch wird jedoch durch eine Beobachtung bei Eps8-*knock-out* Mäusen erschwert (Offenhäuser et al., 2004). Bei diesen Mäusen konnten keine phänotypische Änderung festgestellt werden, was auf das Vorhandensein von Eps8-ähnlichen Proteinen zurückgeführt wurde, die wahrscheinlich ähnliche Funktionen besitzen. Auch im Genom von *S. mansoni* sind offenbar zwei Eps8-related Proteine vorhanden (Smp\_035260.x und Smp\_141030). In differentiellen *knockdown* Experimenten könnte über RNAi festgestellt werden, inwieweit die Funktion von SmEps8 die gleiche wie die eines oder beider Eps8-related Proteine ist, bzw. welche Unterschiede zwischen den Funktionen dieser Moleküle existieren.

Weiterführende immunhistologische Analysen mit geeigneten Antikörpern gegen SmEps8 und seinen Interaktionspartnern könnten diese lokalisieren und deren gewebespezifische Expression endgültig bestätigen. Alle Ergebnisse dieser weiterführenden Versuche könnten zur Aufklärung der Funktion der SER-SmEps8-SmTK3-Signaltransduktion in den Gonaden von *S. mansoni* beitragen.

#### 4.2.4 Identifizierung und Charakterisierung von SmDLG, SmScrib und SmLGL

Anhand von Y2H-Analysen erfolgte bereits die Charakterisierung der Signalkaskade von SmTK6, wobei als ein interessanter Interaktionspartner ein *Discs large*-Molekül (SmDLG; Smp\_170290) identifiziert wurde (Beckmann et al., 2011). Bei diesem Molekül handelt es sich um einen Bestandteil des DLG- *Scribble* (Scrib)-*Lethal giant larvae* (LGL)-Komplexes, der neben anderen Molekülen maßgeblich an der Kontrolle der Zellproliferation in *D. melanogaster* beteiligt ist (Huang et al., 2003). Dabei rekrutieren DLG und Scrib verschiedene Proteinkomplexe zu Membran- und Signalproteinen, welche mit dem Cytoskelett bzw. dem Zellzyklus gekoppelt sind, und koordinieren anschließend über diese Proteine sowohl die Polarität, als auch die Proliferation von Zellen. Ein weiteres Protein dieses Komplexes ist LGL, welches ebenfalls einen Einfluss auf die Zellpolarität in *Drosophila* besitzt (Froldi et al., 2008). Für diese drei Proteine konnten durch Sequenzvergleiche die entsprechenden proteinkodierenden Gene im Genom von *S. mansoni* identifiziert werden (vgl. Kapitel 5.2.5, SmScrib: Smp\_104030.2; SmLGL: Smp\_153310.1; Protasio et al., 2012). Mit Hilfe von BlastX-Analysen und Strukturvorhersageprogrammen wurde der charakteristische Aufbau dieser Proteine aus *S. mansoni* bestätigt. Da sowohl in humanen Zellen als auch bei *D. melanogaster* diese drei Proteine einen Komplex ausbilden (Assémat et

al., 2008), sollten potentielle Interaktionen der schistosomalen Proteine, die eine Voraussetzung für Komplexbildung darstellen, zunächst mit Hilfe von Y2H-Analysen untersucht werden. Dabei konnten Interaktionen zwischen SmScrib und SmDLG bzw. SmLGL identifiziert werden, wenn auch sehr schwach im Vergleich zur Kontrolle (SmTK6-SmDLG; vgl. Abb. 3-22). Im Falle der Interaktion von SmScrib und SmDLG dienten die leucinreiche Region (LRR) von SmScrib und die konservierten Domänen der Partialsequenz von SmDLG (PDZ-, SH3- und GuK-Domäne) als Bindungsbereiche. Für die aus *D. melanogaster* bereits bekannte Interaktion beider Moleküle wurde ein Adaptermolekül identifiziert, welches sowohl im Genom des Menschen, als auch in dem der Fruchtfliege vorkommt (Katoh & Katoh, 2004; Assémat et al., 2008). Bei diesem Molekül handelt es sich um den sogenannten *GuK-Holder*, der die SH3- und GuK-Domäne von DLG Molekülen sowie die PDZ2-Domäne von Scrib bindet (Mathew et al., 2002; Qian & Prehoda, 2006). Im Genom von *S. mansoni* konnte jedoch weder für das humane Protein noch für das Protein aus *D. melanogaster* ein *GuK-Holder* durch Sequenzvergleiche identifiziert werden. Daher wurde eine direkte Interaktion dieser schistosomalen Proteine vermutet und erste Hinweise für diese Möglichkeit gefunden. Die nur schwach ausgeprägten Interaktionsstärken können durch putative intramolekulare Bindungen und darauf folgende Autoinhibierung erklärt werden. Für DLG-Proteine wurde bereits nachgewiesen, dass die benachbarten Domänen SH3 und GuK eine Bindung eingehen (Qian & Prehoda, 2006). Diese Bindung wird durch die PDZ-Domäne, unmittelbar vor der SH3-Domäne liegend, reguliert und inhibiert die intermolekulare Bindung von DLG mit dem *GuK-Holder* kompetitiv. Möglicherweise war ein Teil der SmDLG-Moleküle durch solche intramolekularen Bindungen in deren Konformation nicht ausreichend frei zugänglich für die Interaktion mit SmScrib, weshalb nur eine sehr geringe Bindungsstärke mit Hilfe der  $\beta$ -Gal Filterassays identifiziert werden konnte. Um eine genauere Aussage zu diesem Sachverhalt treffen zu können, müssten weitere Y2H-Analysen mit den Einzeldomänen durchgeführt werden, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich war. Über Datenbanksuche auf Basis konservierter Bereiche von *GuK-Holder*proteinen aus Mensch und *Drosophila* konnte kein entsprechendes Molekül im Genom von *S. mansoni* gefunden werden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass für die Bindung von SmDLG und SmScrib ein anderes, weniger konserviertes Molekül als unbekannter Adapter fungiert. Ein solcher Adapter könnte durch ein Y2H-Genbankscreening identifiziert werden (Quack et al. 2009).

Als beteiligte Bereiche für eine SmScrib-SmLGL-Bindung konnten die PDZ-Domänen von SmScrib und die konservierten WD40-Wiederholungen und LLGL-Domänen von SmLGL identifiziert werden. In Säugerzellen bilden die Wiederholungen der WD40-Elemente eine „propellerartige“ Anordnung aus  $\beta$ -Faltblättern, welche anschließend als Proteininteraktionsmodul fungieren (Assémat et al., 2008). Spezifischere Aussagen über die beteiligten Bereiche bei der Interaktion der schistosomalen Proteine würden Interaktionsstudien mit



den jeweiligen Einzeldomänen gewährleisten. Für SmScrib konnten jedoch bereits die PDZ-Domänen als notwendiger Bereich dieser Bindung identifiziert werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Co-Immunopräzipitationsversuchen von Hek-Zellproteinen, in denen die Interaktion zwischen dem N-terminalen Bereich von Scrib und LGL2 stattfindet (Kallay et al., 2006). Mittels detaillierter Co-Immunopräzipitation für Mausproteine bestimmten Yamanaka & Ohno (2008) die LLR von Scrib als Bereich der Interaktion. Um eine vergleichbare Aussage für die Bindungsbereiche der schistosomalen Proteine treffen zu können, sollten ebenfalls Co-Immunopräzipitationen durchgeführt werden. Eine Gemeinsamkeit beider Studien, der Y2H-Analyse der schistosomalen Proteine und der Co-Immunopräzipitation der Mausproteine, war jedoch eine jeweils sehr schwache Interaktion beider Proteine (Kallay et al., 2006; Yamanaka & Ohno, 2008).

Mit Hilfe von Y2H-Experimenten wurden Bindungen von SmScrib mit SmDLG bzw. SmLGL für *S. mansoni* erstmals beschrieben. Da jedoch bei diesem Versuchsansatz ein artifizielles System genutzt wird, sollten die Transkriptionsorte der Interaktionspartner näher untersucht werden (s. Abb. 3-23). Über *in situ*-Hybridisierungen wurden die Transkriptionsprodukte von SmDLG innerhalb der Reproduktionsorgane adulter Schistosomen identifiziert (Beckmann et al., 2011). Für die SmScrib und SmLGL bestand eine Kollokalisierung innerhalb des Ovars und Vitellariums. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Interaktion der drei Moleküle *in vivo* innerhalb dieser Organe denkbar. Einen direkten Nachweis könnten Co-Immunopräzipitationen mit spezifischen Antikörpern der schistosomalen Proteine liefern, welche jedoch zunächst hergestellt werden müssten. Alternativ könnten Co-Immunopräzipitationen rekombinant exprimierter Proteinen mit zusätzlicher Expression spezifischer Tag-Sequenzen in *X. laevis* Oocyten durchgeführt werden, wobei man auch dabei ein artifizielles System nutzen würde. Im Zuge der *in situ*-Hybridisierungen wurden für SmLGL putative *antisense*-RNA-Signale innerhalb des Ovars identifiziert. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden zusätzliche strangspezifische RT-PCRs durchgeführt, in denen neben der mRNA auch putative *antisense*-RNA detektiert werden konnten (s. Abb. 3-24). In einer neueren Expressionsstudie wurden Hinweise für eine primerunabhängige cDNA-Synthese für Gene von Eukaryoten erbracht (Haddad et al., 2007). Dabei kann es durch das Vorhandensein von *sense*- und *antisense*-RNAs eines Gens während der RT zu einer cDNA-Synthese kommen, die durch die Bindung der komplementären RNA-Stränge (*self-priming*) und anschließendem Erkennen des Doppelstrangfragments durch die Reverse Transkriptase ermöglicht wird. Um diesen Prozess zu unterbinden, sollte die RT bei hohen Temperaturen und vor allem ohne Zugabe von Primern in der Reaktion erfolgen. Für die in Abbildung 3-24 dargestellte PCR wurde als *Template* cDNA verwendet, die mittels einer hitzestabilen Reversen Transkriptase (Thermoscript™, Invitrogen) amplifiziert wurde. Jedoch wurden für die RT keine Kontrollen ohne Zugabe der entsprechenden Primer durchgeführt, was einen genaueren Aufschluss über mögliche *self-priming*-Prozesse der untersuchten RNAs hätte geben können. Des

Weiteren könnte die Gelelektion, Klonierung und anschließende Sequenzierung des *antisense*-RNA-spezifischen PCR-Produktes die Aussage einer putativ vorhandenen *antisense*-RNA für SmLGL bestätigen. Einen weiteren Hinweis auf die Existenz einer *antisense*-RNA für SmLGL könnte sich im Genom des Parasiten befinden, da bereits eine Vielzahl nichtkodierender (*non-coding*) RNAs verschiedener Genen identifiziert wurden (Copeland et al., 2009, Oliveira et al., 2011). Sollte mittels einer entsprechend modifizierten strangspezifischen RT-PCR und der weiteren Analyse des Genoms eine *antisense*-RNA für SmLGL gefunden werden, so könnte diese an der Regulation der Transkription des Gens beteiligt sein.

Eine weiterführende funktionelle Analyse dieser drei Gene wurde durch Suppression der Proteinsynthese auf posttranskriptionelle Ebene in Form von RNAi-Versuchen durchgeführt. Dabei konnte zwar für jedes Gen die Transkriptmenge unterschiedlich stark verringert werden, jedoch führte keine dieser Transkriptionsreduktionen zu einer erkennbaren phänotypischen Veränderung. Für dieses Ergebnis existieren mehrere Erklärungen. Zum einen kann es nur durch eine verringerte Proteinmenge zur Ausbildung einer sichtbaren morphologischen Veränderung kommen. Um aber die gebildete Proteinmenge quantitativ zu bestimmen, müssten Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen jedes einzelne dieser drei Proteine durchgeführt werden. Eine reduzierte Proteinmenge kann jedoch nur bei einer entsprechend geringen Halbwertszeit der Proteine sowie einer verringerten Proteinsynthese auf der Grundlage einer RNAi-induzierten Transkriptionsreduktion gefunden werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass erst bei kombinierter RNAi aller drei Moleküle eine Veränderung der Morphologie auftritt. Diese Analyse konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, sollte aber Bestandteil weiterführender Arbeiten sein. Daneben könnten andere Proteine mit ähnlichen Funktionen wie SmDLG, SmScrib und SmLGL die Ausbildung morphologischer Änderungen unterbinden. Es könnte weiter von Nachteil sein, dass adulte Würmer für die RNAi-Experimente verwendet wurden. In *D. melanogaster* führt der Funktionsverlust (*loss of function*) der drei Gene im Larvalstadium zur Letalität (Froldi et al., 2008). Möglicherweise führen Transkriptreduktionen, ausgelöst durch posttranskriptionelle Suppression der Transkription in *S. mansoni*, ebenfalls in den Larven des Parasiten zu phänotypischen Veränderungen. Für die freilebenden Larvalstadien (Cercarien und Miracidien) wurden bislang keine RNAi-Versuche zufriedenstellend durchgeführt, jedoch kann diese Methode erfolgreich für die präadulten Schistosomula angewendet werden (Ndegwa et al., 2007; Stefanić et al., 2010). Um einen Anhaltspunkt für die relativen Transkriptmengen der Gene SmDLG, SmScrib und SmLGL für Schistosomula zu erhalten, wurden die veröffentlichten Transkriptionsprofile der Gene in der „GeneDB“ untersucht und dabei die stärkste Transkription innerhalb der Schistosomula (24 h) identifiziert. Bei Einsatz von Schistosomula in weiteren RNAi-Versuchen mit anschließender *in vitro* Kultivierung bis zur Reifung der

Schistosomula zu adulten Würmern, könnten sich im Verlauf der Entwicklung der Parasiten RNAi-bedingte morphologische Änderungen ausbilden. Um diese Änderungen zu identifizieren, müssten Schistosomula einer Kontrollgruppe ebenfalls *in vitro* kultiviert werden. Durch diese modifizierten RNAi-Versuche gäbe es die Möglichkeit, dass die Funktion von SmDLG, SmScrib und SmLGL auf die Entwicklung der Parasiten zu untersuchen.

In *D. melanogaster* und im Menschen wirken DLG, Scrib und LGL funktionell als Tumorsuppressoren, d.h. Mutationen in diesen Genen, einhergehend mit Funktionsverlust, bewirken eine Steigerung der Zellproliferation (Humbert et al., 2003). Demnach könnte sich ein möglicher Effekt der RNAi auch auf die mitotische Aktivität der Würmer auswirken, was mit den eingesetzten mikroskopischen Untersuchungen nicht analysierbar ist. Im Zuge der erhöhten Proliferationsrate kommt es zusätzlich zum Abbrechen der Zell-Zell-Verbindungen, den *adherent junctions*, aufgrund von funktionell inaktiven E-Cadherinen (Froldi et al., 2008). Daneben steigt während diesem Prozess der Transkriptionspiegel für N-Cadherin (Vieira et al., 2008). Um diese Ergebnisse auf Schistosomen zu übertragen, erfolgten Genomanalysen und dabei die Identifikation von Genen mit Ähnlichkeit zu Cadherin (Smp\_161520.1, Smp\_135610.1, Smp\_145210.1, Smp\_155810.1, Smp\_155600.1). Daher bestünde die Möglichkeit, die Transkription der Cadherin-Gene nach erfolgtem RNAi-Versuch mit resultierender Reduktion der Transkripte von SmDLG, SmScrib bzw. SmLGL, zu überprüfen. Zusätzlich könnte im Anschluss an die RNAi die mitotische Aktivität der Würmer überprüft werden, was durch eine etablierte, auf den BrdU-Einbau basierende Methode mit adulten Würmern *in vitro* möglich ist (Knobloch et al., 2002b). Einen indirekten Hinweis über den Zusammenhang zwischen dem Transkriptlevel von SmDLG und der mitotischen Aktivität adulter Schistosomen wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits durch die Microarray-Analysen nach erfolgter Inhibitorbehandlung gefunden. Durch Applikation von Herb A in Kombination mit TRIKI wurde die stärkste Reduktion der mitotischen Aktivität *in vitro* detektiert (Knobloch et al., 2007). Neben verschiedenen anderen Genen zeigte der entsprechenden Microarray dieser Inhibitorbehandlung für SmDLG eine erhöhte Transkription (s. digitaler Anhang, Tabelle 8). Aufgrund der Vielfalt der Gene, die an der Regulation der Mitose beteiligt sind, kann ein Einfluss von SmDLG an diesem Prozess nicht ausgeschlossen werden, muss jedoch durch zukünftige Experimente überprüft werden.

#### **4.2.4.1 Weitere putative Interaktionen der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL**

Aufgrund der hohen Konservierung der membranassoziierten Guanylat-Kinase (MAGUK) SmDLG sowie deren Bindungspartner sind Untersuchungen bereits bekannter Interaktionen dieser Moleküle für die Funktionen der schistosomalen Homologe von besonderem Interesse. Dabei können Bindungsstudien dieser Molekülen aus der humanen bzw. der *Drosophila*-Forschung als Grundlage für Interaktionsstudien von schistosomalen

Proteinen mit Sequenzüberstimmungen herangezogen werden. Für Scrib ist bereits eine Vielzahl von Interaktionen mit Mitgliedern hoch konservierter Signalwege bekannt. Dazu zählt die putative Bindung von Scrib mit ERK, wodurch Scrib mit dem Ras/MAPK-Signalweg interagiert (Pearson et al., 2011). Des Weiteren ist die Wechselwirkung von Scrib mit Notch bekannt, wodurch erneut ein Einfluss von Scrib auf den Ras/MAPK-Signalweg besteht (Pearson et al., 2011). Viele Mitglieder dieses Signalwegs sind bereits für *S. mansoni* bekannt, wie z.B. SmRas (Smp\_179910.x, Accession Nummer AAB09439), SmERK1 (Smp\_142050), SmMAPK15 (Smp\_133490), Smp38 (Smp\_133020) und SmMAK (Smp\_210970) (Kampkötter et al., 1999; Andrade et al., 2011). Anhand von Datenbankanalysen mit der Gensequenz des humanen Notch war es möglich drei Notch-ähnliche Gene im Genom von *S. mansoni* zu identifizieren (Smp\_105360, Smp\_050520, Smp\_140800).

Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Signalwege dieses Komplexes könnten sich auf die Interaktionen von SmLGL fokussieren. In *X. laevis* fungiert LGL als Mediator des Wnt-Signalweges über die Bindung von *Dishevelled* (Dvl; Dollar et al., 2005). Auch für dieses Molekül konnten im Genom von *S. mansoni* zwei Gene identifiziert werden (SmDvl1: Smp\_162410; SmDvl2: Smp\_020300 und Smp\_101630). Entsprechend dieser Identifizierung wäre eine Interaktionsstudie von SmLGL mit SmDvl1 bzw. SmDvl2 interessant, um eine mögliche Vernetzung der Signalwege von SmTK6 mit Wnt zu untersuchen. Diese Möglichkeit ist denkbar, da bereits erste *in situ*-Hybrisierungen eine Kolo-kalisierung von SmDvl1 und SmDvl2 mit SmTK6 und SmLGL im Ovar zeigten (Steffen Hahnel, persönliche Mitteilung). Weiterhin befassen sich viele Studien über LGL mit Antagonisten des DLG-Scrib-Komplexes, wozu zum einen der aPKC-PAR-3-Komplex (Yamanaka & Ohno, 2008) und zum anderen der Crumbs-Stardust-Komplex gehört (Yasumi et al., 2005). Für beide Komplexe konnten durch erste Sequenzvergleiche entsprechende Proteine im Parasitengenom identifiziert werden (PAR-3, Smp\_157550.1 und Crumbs, Smp\_162791.0), welche ebenfalls für zukünftige Interaktionsstudien genutzt werden könnten.

Für alle diese putativen Interaktionspartner der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL könnten in zukünftigen Experimenten direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt werden. Des Weiteren wären Y2H-Screenings eine geeignete Möglichkeit, um unbekannte Bindungspartner in *S. mansoni* zu identifizieren. Ein solches Screening wäre auch für SmDLG sinnvoll, da andere Vertreter der MAGUKs eine Reihe von Signalweiterleitungen und Cytoskelettmodulationen vermitteln (Hough et al., 1997). Ferner ist die Identifizierung von putativen *downstream* Interaktionspartnern dieser drei Moleküle wichtig zur weiteren Aufklärung des Signalweges der Src-/Abl-Tyrosinkinase SmTK6, da bereits ein Einfluss der Kinase im Zusammenspiel mit SmTK3 und SmTK4 auf Proliferations- und Differenzierungsprozesse der Gonaden postuliert wurde (Beckmann et al., 2010a; Beckmann et al., 2011).

## 5 Anhang

### 5.1 Alignment der T $\beta$ RI-Moleküle und hierarchische Anordnung differentiell transkribierter Gene der Microarray-Analysen

#### 5.1.1 Alignment der Volllängeensequenzen der T $\beta$ RI-Moleküle von *H. sapiens* und *S. mansoni*

Für das Alignment wurden die Aminosäuresequenzen (AS) der Typ I TGF $\beta$ -Rezeptoren (T $\beta$ RI) von *H. sapiens* (Accession Nummer: ACZ58375) und *S. mansoni* (Accession Nummer: AF031557) verwendet. Grau hinterlegt sind das GS-Motiv, sowie zwei Threonin- bzw. Glutaminreste. Fehlende AS sind als -, identische AS sind als \*, stark ähnlich AS als : und schwach ähnliche AS als . dargestellt.

<i>H. sapiens</i>	---MEAAVAAPRP-----RLLLLVLA-----AAAAAAA	26
<i>S. mansoni</i>	MECMLLLCPAANQSDCRPCSPLSKKHQKNWNRYIDLLSNWEDKLHLPTYRGLKAHPFC	60
	: . * * : . * : * : * : . * . .	
<i>H. sapiens</i>	LLPG-----ATALQCFCHLCTKDNFT-----CVTDGLCFVSVTE	60
<i>S. mansoni</i>	CTPGPGYSCRLNIHEPRKEPRQFYDLTCAKDDFTPIKCQQDNDIRCCSEKHCNVPTSE	120
	** . * : * : * : * * : : * . . : *	
<i>H. sapiens</i>	TTDKVIHNS---MCIAEIDLIPDRPFVCAPS-----SKTGSVTTTTYC	100
<i>S. mansoni</i>	ELMLLVKDSPDLYLVAISLLTILCIILFIVSGTLYFLWRRKSDRQKQISSQNGITSDHL	180
	: : : * : . . * * : : * * . . : : *	
<i>H. sapiens</i>	CNQDHCN-----KIELPTTVKS-----SPGLGPVELAAVIAGPVCFCISLMLMVYIC	148
<i>S. mansoni</i>	WTSNDNIDNKYLKGPLQVPTLTNVNSTYPENARVFPNDPSAVSAGITSRGASSLSHFGSSA	240
	. * : : : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>H. sapiens</i>	HNRTVIHHRVPNEEDPSLDRPFISEGT-----TLKDLIYDMTSGSGSGLPPLLVQRT	200
<i>S. mansoni</i>	LGATPGNINS-CSNSPTGAMTITSSGSNSAMPTTGTPADLMDHTCSGSGSGKPLLVQRT	299
	. * : . . : * : . : * * : * : * * * * * *	
<i>H. sapiens</i>	IARTIVLQESIGKGRFGEVVRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAETVQTVMLRHENIL	260
<i>S. mansoni</i>	VARQVQLEERIGEGRYGVVVRGVWQGLVAAKIFSSRDERSWFRETDIYQTVMLRHANIL	359
	: * : : * * * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H. sapiens</i>	GFIAADNKDNGTWTQLWLVS DYHEHGS LFDYLNRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHLHMEI	320
<i>S. mansoni</i>	GFIAADNKDTGLSTQLWLITDYHPLGSLYEFLLQHQCLTPFALLRAVASITNGLAHLHMEI	419
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
<i>H. sapiens</i>	VGTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCIALDGLAVRHDS-ATDTIDIAPN-HRVGTKRY	378
<i>S. mansoni</i>	TGTQGKPAIAHRDLKSRNIVKMDGECCIGDLGALKLDSSMSALEVNSNSDRVGTTRY	479
	. * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
<i>H. sapiens</i>	MAPEVLDDSI NMKHFESFKRADIYAMGLVFWEIARRCSIGGIH--EDYQLPYDLPVSDP	436
<i>S. mansoni</i>	MAPEVLDTIRLTSPFAFKQADMYSLGLVFWEVTRRCYVRNLFQPDYQLPYQDLVSADP	539
	* * * * * : * : . * : * : * : * : * * * : * : . : * * * * * : *	
<i>H. sapiens</i>	SVEEMRKVVCEQKLRPNIPNRWQSCEALRVMAKIMRECWYANGAARLTALRIKKTLSQLS	496
<i>S. mansoni</i>	SVEEMKSIVCEQGLRPGLPAIWSKHEIRALQDIMSECWYASPARLSAMRVKKS LAGVR	599
	* * * * * : * * * * * * * : * . . * : * : . * * * * * : * * : * * : *	
<i>H. sapiens</i>	QQEGIKM-----	503
<i>S. mansoni</i>	KQLDTNPALSDLSHTNYLPPEATDKLPFGIIRCPVPRNTMNNNTNTNNKQINLLPNLT	659
	: * . :	
<i>H. sapiens</i>	-----	
<i>S. mansoni</i>	STSSIGAATTPGNKSLISGNHINTYNDTNNPLLTTTITITPTTILNSNNIHRNCQCND	719
<i>H. sapiens</i>	-----	
<i>S. mansoni</i>	DNNMLYSSLLYKNGNPNPSYWSNCEYDKLLLFNTHNNNDNNTTNHHHPNEESNNNSNSKH	779
<i>H. sapiens</i>	-	
<i>S. mansoni</i>	L 780	

### 5.1.2 Hierarchische Anordnungen differentiell transkribierter Gene nach Inhibitorbehandlungen

Hierarchische Anordnung der signifikant differentiell transkribierten Gene nach (A) TRIKI- (2330 Gene), (B) nach Herb A- (1021 Gene) und (C) nach Kombinationsbehandlung (H+T; 411 Gene). Jede Linie zeigt die Transkription eines Gens als  $\log_2$ Ratio (Behandlung/Kontrolle), wobei Gene mit reduzierter Transkription grün und Gene mit erhöhter Transkription rot dargestellt sind. Die Reihen entsprechen jeweils drei biologischen und zwei technischen Replikaten (A: TRIKI/DMSO 6 und 5, TRIKI/DMSO 1 und 2 als technische Replikate der unabhängigen biologischen Experimente und TRIKI/DMSO 3 als drittes biologisches Replikat; B: Herb/DMSO 2 und 1, Herb/DMSO 5 und 6 als technische Replikate der unabhängigen biologischen Experimente und Herb/DMSO 3 als drittes biologisches Replikat; C: H+T/DMSO 6 und 5, H+T/DMSO 4 und 3 als technische Replikate der unabhängigen biologischen Experimente und H+T/DMSO 2 als drittes biologisches Replikat).

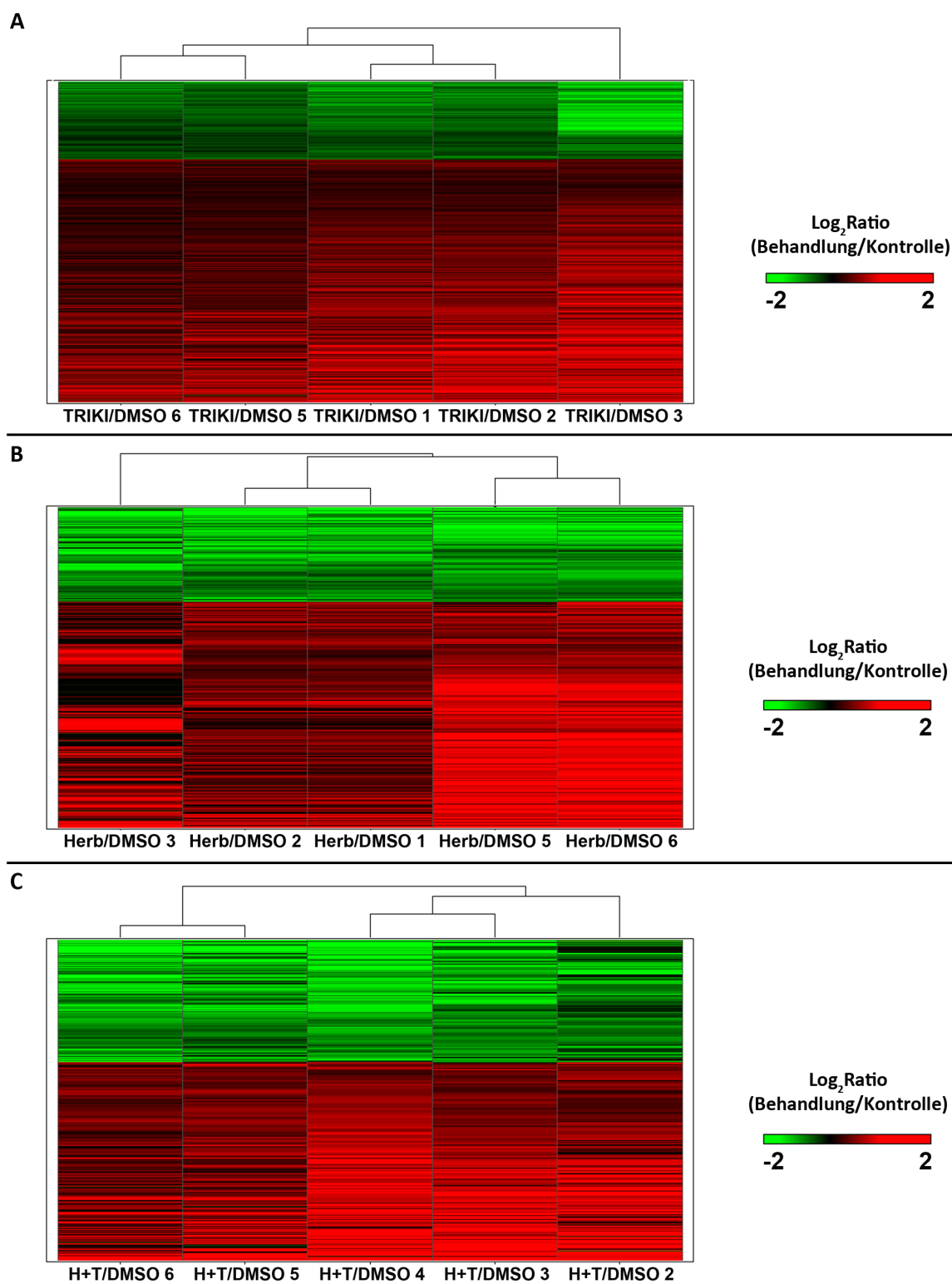


Abbildung 5-1: Hierarchische Anordnung differenziell transkribierter Gene nach (A) TRIKI-, (B) Herb A- und (C) Kombinationsbehandlung,  $q \leq 0,03$

## 5.2 Sequenzen und Alignments verschiedener Moleküle zur Charakterisierung gonadenspezifisch exprimierter Gene

### 5.2.1 Sequenzierungsergebnisse der SmEps8-Klone des Y3H-Screenings

Der Volllängenklon von SmEps8 besitzt neben der putativen 5'UTR ein Start- und ein Stoppcodon (unterstrichene Bereiche) und einen ORF von 2376 bp. Die Sequenzen, die für die konservierten Domänen PTB (hellgrau), EGFR-BD (dunkelgrau), SH3 (beige) und SAM-PNT (anthrazit) kodieren sind farblich hinterlegt.

```
GGGGGGATTTGTTAAGGAGATGAGGAACAGGGATTTTAAATAAAGAAGAGCTCGCCTTCAAAGCGCATCACATTGC
AAGCTTCATTGAAGGAGAAGAAAACTTACACCTTCTAGTGTTGTTTCATCATATAAACTTATTACACGGAGGAGG
TCGTATTGATGAGACACCATGTAAAGTCAGATTAGATAAGAAAGGAATTTTAAATGAACTAAGATCCTCGGAGGA
GGTCGTGGAGTTTTTTGAATGGTCTTCCATAAGTGACCAAGCAGCAATTTTCAAACGTTCAGAAGACTTCCAGTA
TGGCTATCTCATACTTTTTCGGTGCTCACAGTATAATGCAGAGCTCGGGATTAAAGAATCTGAAGTTCACGTCTT
TAGTTGCGAAACGAAAGACGACGCTAAACTACTGGTTGACTCGATATATAATCAAAAAATCTCAGCTCTCGGACT
CAACTCAAATGGAGACGCTTCGAGAAGTCCTGAGGTAAATTTGCGTCGCGGCAGGTCAGAAGAAATAATAGACTC
TACAGGATATGATGGTGGACGAAATTTTTATATGCTTAACCAATGTATAGACGATATAGAATGCTTTGAAAAATCG
TCTAGAGAAAGCGATCAAACGAATGTCACATCATAACAGAAATAGTTTCAGCTGAAGTTTTGAACAAATGTGAGTTA
TCCAAGTAAACAAGACGCTCAAGAAATAATCAGAAAAGTAAATATGCTTTTAAATTTGAATGAACAAATTC AAC
ACATACTCCAGAAGAAATATCAAAAAAATTTTCATTCGACTATTCAACACCGTTTCAGTGGTTGGATAAAGTTTG
TCGACATAATATTGTACCTGACTATGACCAACATATGGTGCGTGAGATTGTTGAACCTTTATTGGAAGAGGCTAC
GCTTGCCACAATTGCAAAAAGATTACAAAATAAAATTGAGTTTTTGGAAAGGACTTGGTCTCTGCTTGGAACTACTCC
ACCTGAAAAATGGAGTGAACATCTTGCTCGCTATTCCCCACAGTTTGCCTCTAAATCTGTTAATAAACGCCAAAC
ATGGCACGCCGAAGCCAACATAGTAACACCGAGCGTAGGAGATGTTGAAATAAAAGTAACACAAACAATCTCACC
ACGCCATTCTCCTATTCTTCTGAACGAGTCAGAACTCCTTCACCGGTGCGTCAAATTTGGCACGGAAACCATAACC
TACGGACAATGTGAATACAACAGTATTAAATGTTACTACTGTTACGGTGGAAAAATCTCCAGAACAAAGAGTAAA
GTCAGCGGATCCACGTAGTAGCTACCCTCAACGTCGTTGGGATTCTGAAGAAAATGGTGTGTTGTGAATGTACT
ACATGTAGGTGCGAAACCTCAAGAGTTAACTGTACAACCAGGTGACGTTCTCCAAATCTAAATACTAGTAAAGG
AGATTGGTGGCTGTTACAAAATGATGCAGGAGAATCTGGTGAAGTACCTGCTTGGAAATTAAGCTTATAATTA
TCGACCAGATCATCCAACCTACAGCTGGATTAAAGAAAACCTCATCAATGAATAATTTATTAAAGTAGAAAACTAC
TGAAACATTTGGAAATGATAGTGATAATGTTTCATTCGGAAAAATCATTCCAATTTCCAGTCACAAAGAAATAATTC
ACATGCGCCTAAAAGTATACTACGTGATAAATCCCCGACTAGACAAACAGATACTTCTGTTTTAAATTTAAGTAT
ACCTAATTCACCTACAGGACAAAATTCACAACATGATAATAGGATTATGAATGATAACGTTAATACCAATGCTAA
TAATAACGTTATGTATATAACACCATCACAACTTCAAGAAGCAATCAAAATTAATAGTAATGTACCAATGATATT
AATTCCAGTACCTAATTTATATAGTAATAATAATTTCTGATATGTCAGCGATTAAATGGTTCGAATCTAATTAACCC
AAATACAAATGGTGTGAGTTAGCAAGAACCTCCTAATCCCGATGCTTTAGGACCAGGCTGGAAACCAGCTCCAAT
ATTGAGTACTTCAGCAACTGAAGCTTTGGGCTACTCTCCATACCCTTTCAATTATCCAACCTCATATGCATACTAT
GACCAGAGAATTGAGAGAAAGATTGTCTAAAATGCAACTTGGAGGAGGAACCTGGTCTTAAATCAGTGCCTATACC
CTCAACAACACTTGATAAACCTGATCAAAGATTGTGCAAAATATGCATCCAAGGAGGAAGTTGCAGAATGGTTCGT
AGCTCATCAATTTCTACCAAAGCTATATCTGCTTTGAAAGGATTTAAAGGAATAGATCTTTATACAATGAATCG
AACTCAATTGGAACAACATGTTGGACCAGAGAGATGTGATGAACATTTTATGCATTCAGAGGCACCTAA
```

Die C-terminal verkürzte Variante von SmEps8 besitzt neben der putativen 5'UTR ein Startcodon (unterstrichenen Bereich) und einen durchgehenden ORF von 756 bp. Die konservierte Domäne PTB ist hellgrau hinterlegt. Am 3'Ende befindet sich ein Poly (A)-Bereich.



GGGGGTTAAGGAGATGAGGAACAGGGATTTTAAATAAAGAAGAGCTCGCCTTCAAAGCGCATCACATTGCAAGCTT  
 CATTGAGGGAGAAGAAAACTTACACCTTCTAGTGTGTTCATCATATAAACTTATTACACGGAGGAGGTTCGTAT  
 TGATGAGACACCATGTAAAGTCAGATTAGATAAGAAAGGAATTTTAAATTGAACTAAGATCCTCGGAGGAGGTTCGT  
 GGAGTTTTTTGAATGGTCTTCCATAAGTGACCAAGCAGCAATTTTCAAACGTTCAGAAGACTTCCAGTATGGCTA  
 TCTCATACTTTTTTCGGTGCTCACAGTATAATGCAGAGCTCGGGATTAAAGAATCTGAAGTTCACGTCTTTAGTTG  
 CGAAACGAAAGACGACGCTAAACTACTGGTTGACTCGATATATAATCAAAAAATCTCAGCTCTCGGACTCAACTC  
 AAATGGAGACGCTTCGAGAAGTCCTGAGGTAAATTTGCGTCGCGGCAGGTTCAGAAGAAATAATAGACTCTACAGG  
 ATATGATGGTGGACGAAATTTTATATGCTTAACCAATGTATAGACGATATAGAATGCTTTGAAAATCGTCTAGA  
 GAAAGCGATCAAACGAATGTCACATCATAACAGAAATAGTCCAGCTGAAGTTTTGAACAATGTAAGTTATCCAAG  
 TAAACAAGACGCTCAAGAAATAATCAGAAAGGTAAATATGCTTTTAAATTTGAATGAACAAATTCAACCACATA  
 TTCCAAAAA

## 5.2.2 Multialignment verschiedener Eps8-Moleküle

Das Multialignment beinhaltet die Eps8-Sequenzen folgender Organismen: *H. sapiens* (Accession Nummer Q12929), *M. musculus* (Accession Nummer: AAA16358), *G. gallus* (Accession Nummer: XP\_416405), *X. tropicalis* (Accession Nummer: NP\_0010702508), *D. rerio* (Accession Nummer: NP\_956536), *D. melanogaster* (Accession Nummern: 1: AAF21013 und 2: AAL13963), *A. mellifera* (Accession Nummer: XP\_392229), *C. sinensis* (Accession Nummer: GAA35243), *C. elegans* (Accession Nummer: CAJ44244) und *S. mansoni* (entspricht der vorhergesagten AS-Sequenz der Vollängenklons des Y3H-Screenings). Fehlende AS sind als -, stark ähnliche AS als : und schwach ähnliche AS als . dargestellt.

<i>H. sapiens</i>	AAVAFKPTSNRHIDRNYEPL-KTQPKKYAKSKYDFVARNNSELSVLKDDILEILDDR-K	566
<i>M. musculus</i>	AAMPFKSTPNHQVDRNYDAV-KTQPKKYAKSKYDFVARNNSELSVMKDDVLEILDDR-K	565
<i>G. gallus</i>	AVAAFKQTVSRHVDRNYEAHNKTQSKKYAKCKYEFMARNNSELSVLKEEIVEILDDR-K	567
<i>X. tropicalis</i>	-----NFEERDQVEAQRYALCKYDFVARNNSELSVLKDDVLEVLDDK-K	529
<i>D. rerio</i>	-----NLDASHRTAQRFASKYDFVARNNSELSVLKDEVEVLDDR-K	512
<i>D. melanogaster_1</i>	GGRGLPNVSDQMLSEWLEDLQATGAKIVLVITYPRTANNDKELSVMRGEYLEILDDR-K	695
<i>A. mellifera</i>	IERTPRTAGMERAQEAWLDDLVARHAKIVQVITYPRTANNDKELTVVRGEYLEILDDR-K	561
<i>D. melanogaster_2</i>	-VPVPMPPSPGLGNRTWLSRLESNRVKIAEVTFNKSATNDKELKVTKEYLEIIDDSR-N	450
<i>C. sinensis</i>	KKQGERKVARNRQTRLNNSVDLEFWLYYATVRHVGSKPKEISVSPGTILEVLDDTDLD	265
<i>S. mansoni</i>	KSPEQRVKSADPRSSYPQRRWDSEKWCVVN-VLHVGAQPQELTVQPGDVLQILNTSKGD	470
<i>C. elegans</i>	-----QSMQRTPKSRPPHRNMSVDNLEFDRLTLERERLEFEKAKIMERESRLRHE	547
	:	:
<i>H. sapiens</i>	WWKVRNASGDSGFVPNNILDIVRPPEISGLGRADP---PYTHTIQKQRMETGP-RPAD-TP	621
<i>M. musculus</i>	WWKVRNASGDSGFVPNNILDIRTPESGVGRADP---PYTHTIQKQRTETGL-RSAD-TP	620
<i>G. gallus</i>	WWKVRNKGSGTGFVPNNILDLRNYEGGLGLPEP---VYTRAIQKQRTDYVA-KQPDVP	623
<i>X. tropicalis</i>	WWKVRSSGAVGFVPNNILVAMKPDQSAKPEA---AYTHTIQKQKSDLIQ-SQAGPIP	585
<i>D. rerio</i>	WWKVRNGAGASGVVPNNILEISRVD-MTGRGEP---IYSHTIQKQRTDYVPRPTVTEAP	568
<i>D. melanogaster_1</i>	WWKARNMRGQVAHVPHITVTPNFNGDGDGAQFYG-----QQQPPPTGPTGPGNKS	746
<i>A. mellifera</i>	WWKARNRSGQVAHVPHITVTPNPHSHNDNDVFNNPLYTSRYPRQGHSYNYEVRDSEIER	621
<i>D. melanogaster_2</i>	WWKARNYSGNIGYVPHITVTPNFEPGVN-----GRDTEISLASMALTENG	496
<i>C. sinensis</i>	WWTVRDQNGAEGEIPRWKLQESVPRARTPEQDPP-----LRQSPVVSNTALKHQSLP	317
<i>S. mansoni</i>	WWLLQNDAGESGEVPAWKLKAYNRPDHPPTAG-----LKKTPSMNN-LLSRKSTE	520
<i>C. elegans</i>	EKQIEDEKRRMHAEKDLITKETQFPVPPAAVVT-----HQPIPKRYDPP	592

## Anhang

<i>H. sapiens</i>	PAPSPPPTPAPVP-----VPLPPSTPA--PVPVSKVPAN-----	653
<i>M. musculus</i>	SAPSPPPTPAPVP-----VPLPPSVPA--PVSVPKVPAD-----	652
<i>G. gallus</i>	ATPSPPPMPAPVPA-----AVPLPPSTPAPIVPVPKAPAT-----	659
<i>X. tropicalis</i>	AAPSPPPNPAPTY-----SPLANSQQPTLPVAKLFTAGP-----	619
<i>D. rerio</i>	PTPTPPPPAPLLPTASAPANQSAAAIIPANQSTGATSPANQRAVATS-----	615
<i>D. melanogaster_1</i>	SGDNPGEQRS-----PDPTDMMRSKHLGKKGE-----	774
<i>A. mellifera</i>	TSTSPGPEATHRTH-----AIPPPAPADWVRKERLGKKDESNEETTSIGSNKVT	670
<i>D. melanogaster_2</i>	EEAIPPPLYRNTMA-----MYTAPVEQPAANGKAMQRTFS-----	531
<i>C. sinensis</i>	PIQVQGNVSGDSD-----VDAAAEASKASEPSSSKRQQN-----	352
<i>S. mansoni</i>	TFGNDSDNVHSENH-----SNFQSQRNNSHAPKSI LRDKSP-----	556
<i>C. elegans</i>	ISISPPPQRNNYSH-----	606
<i>H. sapiens</i>	-----ITRQNSSSSDSGGS	667
<i>M. musculus</i>	-----VTRQNSSSSDSGGS	666
<i>G. gallus</i>	-----VSRQSSTSSDSGGS	673
<i>X. tropicalis</i>	-----ISRQSSSLSSDSGGG	633
<i>D. rerio</i>	-----PANQSTAAADQANQ	629
<i>D. melanogaster_1</i>	FRYF-----	778
<i>A. mellifera</i>	FKSNINEKTSSINEDQKSXSNEVTEVVEIHAPPDVRREEIAKEMSSLASTIAPPPPPPP	730
<i>D. melanogaster_2</i>	-----MPNVFVPPMP-----PPSDSQTPTPSGT	555
<i>C. sinensis</i>	-----ASGMSMDLSQPTKSPSPQTVSHS	376
<i>S. mansoni</i>	-----TRQTDTSVLNLSIPNSPTGQNSNNDN	582
<i>C. elegans</i>	-----	
<i>H. sapiens</i>	I-----VRDSQRHKQLPVDRRKSQLMEEVQDELIHRLTIGRSAAQKK	708
<i>M. musculus</i>	I-----VRDSQRYKQLPVDRRKSQLMEEVQDELQRLTIGRSAAQKK	707
<i>G. gallus</i>	V-----ARDSQKHKQVPVDRRKSQLMEEVQDELVHRLTIGRSNAQKK	714
<i>X. tropicalis</i>	S-----VREQHGLQQVPADRRKSQLMEEVQDELIHRLTIGRSAAQKK	674
<i>D. rerio</i>	SESNSGEQHDDTVSESDSVNMRQQREERAAPANRRKSNMEEVQDELMYRLTLGRSAQKKRI	689
<i>D. melanogaster_1</i>	-----	
<i>A. mellifera</i>	LEN-----QISVSSNNSCKSVTLKSNHTIGGVKTEKKVQELKQVLMIFR---EKK	778
<i>D. melanogaster_2</i>	LKR-----NMAAGALAAAMRARNCEADDQLYYMQGDVHDELRL--LLQQQR---ERR	602
<i>C. sinensis</i>	HLS-----VPQGNMIYMTAEQIQELLKSPNRNAQLPVIIVPINELQNYTSQTSISSGVN	430
<i>S. mansoni</i>	RIMNDNVNTNANNVMYITPSQLQEAIK---INSNPMILIPVPNLYSNNSDSMAINWS	639
<i>C. elegans</i>	-----VKVTVSDTSPRQQAFIDDIVAKGGKLAVVTVYDRGGQNTK	646
<i>H. sapiens</i>	FHVPRQNVPVINITYDSTPEDVKTWLQSKGFNPVTVNSLGVLN-----GAQLFSLNKDEL	763
<i>M. musculus</i>	FHVPRQNVPVINITYDSSPEEVKTWLQSKGFNPVTVNSLGVLN-----GAQLFSLNKDEL	762
<i>G. gallus</i>	FHVPRNPVNVINITYDSSPEDVKAWLQSKGFNPVTVNSLGVLT-----GAQLFSLNKEEL	769
<i>X. tropicalis</i>	FTVPRNLNAPAVHISYSSPAEDVKSQWLQAKGFNSVTVDLGVLT-----GAQLFSLTKDEL	729
<i>D. rerio</i>	QTPSRSSQPALSISYDSTPQQVKDWLMLKGFSAAATVSSLGVLT-----GAQLFSLNKDEL	744
<i>D. melanogaster_1</i>	-----	
<i>A. mellifera</i>	EYYGTSIDREPVLQDYSTPREVQNWLTFKGYSEKICKQLRDM-----GSEIFNLTERQL	833
<i>D. melanogaster_2</i>	KDLEILKTPEIFITQNSKPFSEVEEWRGKGFSDI I I KRLHTLS-----GEEIFALSPTI	657
<i>C. sinensis</i>	GNMGCFDN-SVPMRWPELNEMREPMMPARLPSPPI LSSYGGAP---LATHMHTMTRELR	485
<i>S. mansoni</i>	NLINPNTNGAELARTPNPDALGPGWKPAI LST SATEALGYSYPFNYPTHMHTMTRELR	699
<i>C. elegans</i>	ELTVHKGEYLEVIFDERNWWECKNMHQRVGYVPHTILSMVPFE-----QQQYASPNHHN	700
<i>H. sapiens</i>	RTVCPE---GARVYSQITVQKAALE-DSSGSSELQEI MRRRQEKISAAAS-DSGVESFDE	818
<i>M. musculus</i>	RSVCPE---GARVFNQITVQKAALE-DSNGSSELQEI MRRRQEKISAAAS-DSGVESFDE	817
<i>G. gallus</i>	RTVCPE---GSRVYSQITVQKSALE-ANSGSSELQEI MRRRQEKISAAAS-DSGVESFDE	824
<i>X. tropicalis</i>	KTVCPE---GPRVYNQVTVQKAAIE-EQSGGSSELLEIMKKRQERINMAAS-DSGVESFDE	784
<i>D. rerio</i>	KTVCDD---GARVFSQISVQKAALE-RSSG-SELMEVMRRRQEKLAATATSDSGVESFDE	800
<i>D. melanogaster_1</i>	-----	
<i>A. mellifera</i>	EQYFGIAE-GAKLFSQILLARNENKTKSRTSELKQILEKARHKVEEQ-----	880
<i>D. melanogaster_2</i>	ESYFGRRE-SRRLISQIVLQKNCFEYKTI RSSELSAKLARARQKADQSNGNPNVEF----	712
<i>C. sinensis</i>	ERLSKMREGGGLRSVSPPTTSDRPGRLTKYSSKEDVAEWLVASHFPNDVTNLHM	545
<i>S. mansoni</i>	ERLSKMQLGGGTGLKSVPI PSTTLDKPDQRLSKYASKEEVAEWFVAHQFSPKAI SALKGF	759
<i>C. elegans</i>	NSSSTGGYNNHHQGPGLPEDAPSYVKERQGKRGEFRYF-----	740

<i>H. sapiens</i>	GSSH-----	822
<i>M. musculus</i>	GSSH-----	821
<i>G. gallus</i>	GSSH-----	828
<i>X. tropicalis</i>	GNSH-----	788
<i>D. rerio</i>	ASSH-----	804
<i>D. melanogaster_1</i>	-----	
<i>A. mellifera</i>	-----	
<i>D. melanogaster_2</i>	-----	
<i>C. sinensis</i>	NKQHGKTMQMACASYCPGAIILDRWIKQRTKIPAKDALHANADWR	590
<i>S. mansoni</i>	KGIDLYTMNRTQLEQHVGPERCDELFFYAFRGT-----	791
<i>C. elegans</i>	-----	

### 5.2.3 Sequenzen der EGFR-Moleküle in *S. mansoni*

Als Molekül mit Ähnlichkeit zu EGFRs ist bereits SER in *S. mansoni* bekannt (Smp\_093930.x, Accession Nummer M86396; Shoemaker et al., 1992). Als zwei weitere EGFRs sind SER2 (Smp\_165470) und SER3 (Smp\_152680; Andrade et al., 2011; Avelar et al., 2011) identifiziert worden. Von diesen drei EGFRs sind die annotierten Volllängeensequenzen als AS dargestellt. In hellgrau hinterlegt sind die jeweiligen Transmembran-, in dunkelgrau die Tyrosinkinasendomänen. Der Bereich zwischen diesen beiden Domänen wird als Juxtamembran-Bereich bezeichnet. Der rotmarkierte Bereich in der Sequenz des SER entspricht dem amplifizierten Bereich für die *in situ*-Hybridisierung.

>SER: Smp\_093930.x

```

MNFLPLTLVIIIFALNCWSLKFSISEYPWIKACRVWERDCSKPNPKHIQLTYIKFLYGGCTHIIGNLVICGLEKLE
NGSDPDLSFLEKIEDVSGYVYIGQNSVKTISLPSLVIRGEPGYRIMNTSAALVISRNSLEILDRLSLTAIQRND
IVALNNQFLCNFGFTIDWEQIFEDNRKQMFIPDRKEKTVSHAGCDIALRKYTDRTKHSCHGSCPVVNGRGYCWG
PKPEMCQKVLKCANPNPNYCLGGRATTQPCLEECLGGCETRPGNCRACKHAMNDGKCVSQCPPPLIVSREESRTV
QNPEFKYTFHDICVKNCPAPFLKSDSYCVIECDLNTQIPVNGTCKDCPKSGCPEDCKEETIFVNGSLNILQSSSL
RKFKSCVYYTGGLYISKESFQKSSLFPDPIQNVNELYNLLHLKSIVGYIYFDLREAPEELKNLTFLENLESVVLE
VKSQSPGAVITIMNGENIESFGFKSLTNIGGYVYLKNMPKLCYISALTKMLPVRMIDVQDEELCAKRGHVCHSEC
LPELGCWGADANMCAHCCGLKAGEYCVSRCTDHPGFYELPTPFNHSILGKTTNPNVCRTPPLTKSDMAEMDEQAI
IASVIPSKTCAICHPECAQTCTGPNANQCVGECKHYQHGDTCLECPRNTYIDPQTRHCLPCNESCSHILTTGQN
QLCSGPGNFGGLGGCETCWTVIQDKITNKYQCLPDDCPPKHYESYQTQDFINKEKIIVSSHSQVKKGELGGMIR
VCKPCHPFCDLCTANGTHASICHSCTHWWFKSECVEICPPFVCNSSCPEDRNHIFHGMCLTAEQNARLSGQTARE
LRNRILIGVSVSVFIIIALVTIILVVCLKRKAEEKIREQLRSAYTNLLEPDMKTQSVSREPNMGRLEMINQDDL
FCDFNSAPLGTGSFGAVYKGVWVVKPHALLRYNWHRGAQLDVAIKVILNDSPECSVTANPSSPFEAGNSSYSEE
AKRASVRANIEELLQEAKIMASVMHRHCLPLIGICLSSERHCLVSIFFVELGALDRYVKQHADELNSLTLLSWAEQ
IADGMSYLEMRGIIHRDLAARNVLVQTREHVQITDFGLAKMLERRDEDSVIVKAGRVPIRWLAIETLQYGIYSHK
TDVWSYGVTLWEIIFTFGKRPYEDVDTVDIKDHVIKGGRLTQPDICTLDVYMLVKCWMEYDSRPTFIELMRTE
N
TFCKTPGRYLYIEGDQYAINFYHNTNSGSGNFSSSESHELQPMLSVRGIPDGGTTPHRNNSLHRHHTMLTEPSMTR
PYSSGKLLRALSDQPSERSDLFSVGQTGEHTETQLLLPIRSNNSNSGNHSTWQSRQHGVTGASSNTSDTNFSGL
GRIWKRSNFDKVNNTDNTSLLKQRKAPLASREDSWLNDIPRQSDHSESRSVALSDPATASTTAKTSEWSGISPY
NQSRNHSNFGGKNLEEMNTKFSPTHGNSSNSFGKNTVSDYLLDPPPPPVPRGLPDEYLPKTKNPTNTSHAYS
SALSKSMNYTELGPMTNPSTTRDEYLSNMQPPEEYLSPISSGFSVTNPEYLMETYGHPQQYPEPNTLKQSTN
PASDSNSPLKFQDKTNQKESSLEL-

```

## &gt;SER2: Smp\_165470

MLEADEVIRFELNLLNNFYENKLITQSRNQYHNVPISNNFNIVLTCLILENGKIFQTDGSDPDL SFLKSIQEISGY  
LIIMHSNVNNIPLSNLRVIRANNGGYKIHDELDFAAIIRKKNYKDGETLKHVDLHNLKSIVRGSVYIYDNPGQLQY  
LPDSIHWTLEFESVGEQNFYSHKLIQTNSYGEKNITIDLQLYEHNPHDIEPEPVSASVKSSCSKLCPKINNTYC  
WGSPSPDCQYQSKCQNLCLNRLRIRNSYSCCHEQCLGGCTGPLASQCVSCKEYNSGTCVAHCPSRTIIEHGKL  
ISNPEFKYRLGNLCLSVCPDGFMEVDVCVTHCSTGSMSTDGRICLPCQDKCPKSCKITDKETKSGRKMSNFDLG  
NLNQLINCTILEGNLILTKEFNPSSDLTDHIPITDHHQLWALHSLREVTGYIYLDLELLGDSLRFNFSFLENLVK  
VSGYLPSARVSIIMINSKAHFPGRLSLRQVPHGRVIFHQPNPLCYLSSLPWTNSGCLTFVGIIESFNYVCHPACK  
KEYGCWGPDPQCVRCYSRRAGLHTCVQSCSNLTGYMSEQWEKQLQISKKNDFGNLSLTKNFHLNHYHTAETEDVC  
VPCHPECGKSCTGPGAHECIGSCKTAWSDGQCVSECHANTYLNMDRRICEPCQTHCHQRQLTKQPVCTGPGRHPG  
KGGCNKCEKFIVQSPFNQMNTESISGDCPPGTYLTTEVVQPNTLFAKYAEIFTSVAAVCRSCHPRCPVCTAYSLLR  
ANEQRLGCMKCNCFWLRDACVEHCPVENHLNLKDSNLKYNGIYVRHLNGQCLACHEQCHAGCWGPDPQCNHCLN  
VKVPIRLNLHLHYHGKFI CLPQCPNDLYNHIVNIPEMEGII GLRKSSSYFSSVNGSIMHRKLKNDP VILIMIPLCI  
ILIVFAVLVFI CYRYSNQYIKKYEHSPLLLLKSLFCPLSFISKPPNLGRLVMINLDD LCLNEKSGPLGTGAFG  
AVYQGIWKVCQTDYPNLPNINYVITANNEEELMLKVNSQSSCSFQTSNSVATTSKASTEKSKKEYKLLCVAVKIL  
NEVRGSSDLQALLDEAKVMASVSHYHCLPLLGICLSQSRKCLVSAYVVNGSLDRYLRLRAPNIDSLILLD WASQI  
ADGMAYLQSRGIIHRDLATRNLVLTSP EHLQITDFGLAKMLESEEEAKRNEVIVCSGRVPIRWLACETLTHRIYS  
FKTDVWAYGVTIWEIFTFGDKPFDRIETANVKDHVLAGGRLPQPDICTLELYQVMLNCWNENPDARPNFVELYNM  
FKDFARQPHLYLHPRNESSSNT EYVSSTGDTRSRTTIYPTTRLSEGERFRQPDQTVPSFQSMKSRNSCSPLQNSSS  
SSGLTNRFRDVGRRTRTSLLLPPTVLQANRTGKYPRHKRRSVGARTDYTMSASLSINSIGIGERWGNSSFATHSHP  
TLIKVDEANGTANISHNFKINSNTSGNNRNEQFNVGLFSTDWASSGQPLLSSDQESSLSHMLSNFGYTSSS  
RSSMTVNSPGQHNRNFSLAGSSVPTESRNEQQSVDEPTSNTRIGLDVRSGLPVNTSFEAAAGYVWPQWPD AIP  
NPENSNLDQANSSETSYVLTAIDSESENNLPFLNRQLWLRNARQRRYYLRQLQMHRSVADSSLPEQAGEDAMDE  
TSSWAEPLRSNQSNPNGQQEDSDTDPGSADRYWPDPTYSTQNV-

## &gt;SER3: Smp\_152680

MKNFNPNC THILGNLIISGVDEDDDVTLLENIEEISELRLSHLKLKIGHEWIIFKSRKVALLVVSNYKQNDLLSS  
SNVSSQSTSSVNDTGKQRYGLSHLQSLMTSFISVVQHGIYFYDNPGLCYTPFTLKWDEMI ESSELQTDLYALH  
SNDNITLCYENTTSSITVISNERIHDDNHTVKMNL SKIDNKSIMNYSMEYPSLPCHTSCPLIQGKRYCWGPGRDQ  
CQAEQCCHSECAASCYGP RARDCNACLRLSNRGVCTDSCPASKKYNKSTFSWVENPDGLLTFGMICVKSCPKTYL  
RDDDHCVSKCARPGYMTYQGE CIPCPNSICPKICTLNEIESIKGIDYLHRKSLHAMENCTVFEGDIKLSMQSFIG  
DPFYNLSQIDEGVKWKDLII GLSKLEYITGTLYISAGSHAPWMTNLTFLSNVKIIIGGISPNIQQTRTVNINLNHH  
LEFLGMTSLQKLGHPSLLITGNPRLCYVD TIDWTSLLNDET FVDELHDKGTKISKLIKTFNTNLNNDSLAQIILR  
HKKDSKRKRPFKDSTIFVGGNAHF EFCCKRGAVCDELCPHSGCWGPGRQFCTLCKYWSIENIDNGGRICMEHCE  
DLPGFYTPKLN DTHSNLEQILNRSNIVIDVQNLSTAVYNNEINKSTTELINKYYSKENKIFSSAQCKKCSDMCS  
LQNQTCYGPND DQCIGLCRFVQDGPFCRAYCPPNKYTDPI TKKCMESSTCTPPGDIENGNIYINNLLNQKIEN  
KLKYYCTGSGDWPGNGGCSFCKQTVLYLEPKNSNHHLKCVNSCPFGTYQHVINLHHRGGSSVDRQSTVSFNIKEQ  
NSSMNRF TWSQTDANLFHNFPSKIIDEISLWLLNHTQPQLYGLAQICLPCNEQCHSEI ISSRQSSLIGSSNVACY  
GPSPEQCVR CAYASYQGRCVSTCPSGTYPKKKSLRNFDPTLLNDYYIGYLPDNITSFECLSCHKECEIGCSGPTA  
EECTRCHVKIYHDSQMKSWLCNNTCPDFSPFKIFDQKTGEI ICSSDSINLHIIPYNGQYSIENHLNSTILHNS  
YNNNIVTMATKNL NFLQNIHMMNYYNIWHYHYLSTQTAGL ISSLSALFIMLLLSLIYWTIYKR SKYIRIEQYD  
TTINTTDNTTNTTGTNNNNNNKGNKSCFISLNKICEKFWTQGKPQLVIKKKKKEKNKEKRKSKTFTIATKNHRS  
ILNYKNNQLIKEKLLFHPLNWNHSLIPMNGSLLLDKDNKWMNMDEEKSPTHSESLKPNMATLRIITESE LIRGP  
LIGSGAFGTVYCGVWCPKFTRQKLDPINNDTYSTITNSTITPTSNVFN SKKFDWDKNTNGTETIPGGFNNDNYFN  
LHIPVAIKVLSDSADPQTNKELLEAKVMATVDHPCCVRFLALCLTSKLQLITQYLPGLSLEFIKIRWDFIEVN  
SLFQWSEQIASGMIYLSRGI IHRDLAARNVLVQSKDQVQITDFGLAKCLDTTHSEYHASGGRMPIKWLAIECIQ  
DRIFSSKSDVWAYGITLWEMCTFGHRPYENI HAKNLLDFLEKGNRLPQPETTS LDFYCLMLQCWQADPNLRPTFK  
ELCSALCEMKATPNRYLFITPELRTSNFTNQDTSQNALEFLTSCLTDTTISLKSTHTNISSIQSYQQIYNDLNEY

NNHSLLNQLNIEDYTYQYTMNYDWLNNLYVTLPNQYIDNININDPRDNSIHHCNDILIDAEETNRNEENLVTKES  
EGSFMEESSENVSLSLILQMSAQILINIIILILLMKKIIVIK-

#### 5.2.4 Alignment SmAbi-2 und HsAbi-1

Die Sequenzen des Alignments entsprechen Smp\_085740 (SmAbi-2) und der *Accession* Nummer NP\_001171594 für das humane Abi-1. Fettgedruckt in der Sequenz des *H. sapiens* Eps8-Proteins (AS 302-306) ist das Bindemotiv der SH3-Domäne von Eps8-Molekülen, identifiziert nach Mongiovi et al. (1999). Fehlende AS sind als -, identische AS als \*, stark ähnliche AS als : und schwach ähnliche AS als . dargestellt.

SmAbi-2	---MRMIESRLADSRHKLIETSNNIEKAAAFCSSEKYLVNP-KSNTLDESLELAQAQSI	55
Abil_hs	MAELQLMLEEEIPSGKRALIESYQNLTRVADYCENNYIQATDKRKALEETKAYTTQSLAS	60
	:.*.....: ***: **: .* :*.::*: . * ::*: *:***:	
SmAbi-2	VAVEVCNIYLEKVARKAVGSFTVSRVPVVYQHGVLPPEPPQKYIRQPINFSSILDNVGHGI	115
Abil_hs	VAYQIN-----	66
	**:::	
SmAbi-2	PTQDPVSNNYYGQSFIQASTLTRRGSSSASGQLPGRQHSTVACRTMNPKPCLEYAAPTNNL	175
Abil_hs	---ALANNVLQLLDIQQASQLRRMESSINHISQTVDIHKEKVARREIG-----IL	112
	. *. **** * * ** . . *. ..* . *	
SmAbi-2	RPOVSTVGRATIVICRGGMLPPQQFLNACGLVMQHIPPGGINSVSGSISSNYASSAAFCEMN	235
Abil_hs	TTNKNTSRTHKIIPANMERPVRYIRKP---IDYTVLDDVGHGKWLKAKHG-----N	162
	:. *. :*. ..* * ::: : : .... .* :..... *	
SmAbi-2	NRTVNPDILTCTTMSARSRSKGSSSGTGSNAPQYHSHHYTPGQTYIQSSNNEQPMHTSHV	295
Abil_hs	NQPARTGTLSRTNPPTQKPPSPFMSSGRGTLGRNTPYKTLEP-----	203
	*:..... *. * ..... *. ** *: . : :. *	
SmAbi-2	TYNKPTVQSQYMASQISHAVVSGTSQSAYNNKEDRHLLSDRNVEVVVTGQTHLLQSQQOND	355
Abil_hs	-VKPPTVPNDYMTSPARLGSHSPGRTASLNQRPRTHSGSSG-----GSGSRENSGSSSI	257
	: *** :**:* . ....*: *.~ * . . . *. :* ...	
SmAbi-2	RITSVLATDSPEILHSQQLLTEQLPQYQQNRDHSVVIYQKQSTLEMKNINKMGQLNIASQ	415
Abil_hs	GIIPIAVPTPSPTTIG-----PVADSPTP	280
	*. ~.:* ** :	: ~:
SmAbi-2	AVPSTQSQHQTTFNEKPVGEDEHLTIPPPGAFRYDNRESQVNQIKQEVENFGDPLAMQN	475
Abil_hs	PPPPPPDDIPMFDDSPPP-----PPPP <b>PVDYE</b> DE-----EAAVVQYNDPYAD--	322
	. *.. ~: *~~.* **** ~. *:~* ~. *~~.* *	
SmAbi-2	SRLIPRPSPDPAWAPDFYIEKVITMYEYVRDKDELDTFVENQIIYVIKKNDGDGWEGIMN	535
Abil_hs	-----GDPAWAPKNYIEKVVAIIDYTKDKDELFSMEGAIIYVIKKNDGDGYEGVCN	374
	.*****. *****::~:~.:*****::~:~. *****~.**: *	
SmAbi-2	GKTGLFPNGYVEPFSTE--	552
Abil_hs	RVTGLFPNGYVESIMHYTD	393
	*****~.	

### 5.2.5 Sequenzen der Moleküle SmDLG, SmScrib und SmLGL

Als Moleküle mit Sequenzübereinstimmungen zu DLG wurde SmDLG (Smp\_170290; Beckmann et al., 2011), zu Scribble SmScrib (Smp\_104030.2) und zu *Lethal giant larvae* SmLGL (Smp\_153310.1) für *S. mansoni* identifiziert. In blauer Schrift sind die Bereiche für die Sondenherstellung für die dsRNAs der RNAi-Versuche dargestellt. Hellgrau hinterlegt sind die jeweiligen Bereiche der Sonden für die *in situ*-Hybridisierungen von SmScrib und SmLGL.

>SmDLG: Smp\_170290

```

ATGGTCGTTTTGTAAAAACAAAAGGGATGCACACCTAGCCTTAAATCAGATAACAAACTACCGTAATCGCTTAGAC
AATGAAAAAGATGGTTTACTGGTTCAGGCTCTTAATCGGTTAATGAATGTGTTCCAAAGTAGACTGTTTTTGGGT
CTACTTGATATACAAGAGTTTTATGAAGCTATCCTATTAGATCCACAGAAAACAAAGGAAGAGAAAACATCAGCC
GCTCTTGAAATCGCATCAAGGTGGGAAAATATATCAAGTCCATCATTGGTGGCCTCTACAACCTGACTTGAGAATA
CCTCATAGTTTTATTGAAGAAAACAGATTGTTTTGACAGAGCGCGCTCAATGTACCATATTAATTTGGATAACTCA
CAAAAGTCTTATTCAATACAACCTACTCAAACATCACCATATCATGATCAACATGTGGTCAACTTGGATAAATCA
TGGAACATGTGGAATCAGATCTAAAATATGAATATCAATTATCTAATTCATTACATAATGTAAACCAGCCACCA
TCGTTTCGAGAATAAATCAGATAACCGACTAAAAAGAAATACTGATACTGAATTTAGAACAGAAAAATCCTCTTTTT
ACGGACGATCGGTCTAATAAGAACTATATGATATAAAAATTGTCACCTGACATTCCAGTGGCAAAACCACGTCAA
AAACGTTTTGAAACGACCGAAATCAACTTTGACCCATGAATTTGATGCTAGTTTGTCCAGAAAATTAGATGAAAGT
ACTTGTTCAAATGATCTTTTTATCTATTCAATGATGATATTCCACCAAATAATCTTGAAAATGATGAATTTAATGAT
GGACAATGGGCTTTACTCAGTCGTTTGCCTGTTACTATGGAAGTTATCATTGAAAAAGTTCTAAAGGATTTGGA
TTTAGTATTGCAGGAGGCGATGACAACACTTTGGGTCCAGATGATAATGATACCGATATTTATGTGACACGAGTT
AATCCTGGTGGTCTGCAGATCATGAATCAGGTTTACAATTTGGTGACAGAATACTATCAGTCAATGGTATTAGT
CTTATCGGCGCTACACATAATGAAGCAGTTAAAGCTTTGCAACTGGCTGGTTCCAAATTTAAACTGATAGTTGAA
CGTAAAGCAGAACTAGCTATTTCTGAACAATATTCCTGATGTCTTGTCTTCGTCCTATTCTCATCTAAACCT
CTGATAAATCCTACGAAACAAATTATGAAAACCTCACCGAAAACCTGTTCAACCGTCAAATCATCAACCATCTTCA
TCAAATCAATCATTGAATGCACATAATATTGAATCGTTAGCTAGTACAAGTACAGGCAGTGCAGGAGGAGTGAAG
AGTATTGAATGTGGTGCAAGTATAACAACAACCTAGTTTGATAAGCGGATCTTTATTTGATCATAGAGATAGTAAG
CATACATTGAACTCAACAATAACAACCTTCAACAACAAATTGCCACATCAATCAACCAGTGTTCATGTATCACCT
TCAATGACTGGAGTTATTGTTGAACCGAAGCATCAAAGGTCTGGTAATGTTTACAAGCCATCACACGATTTGAAT
AATGCTACAACACAAAATAATCAAAAAGGTAGTCAAACCTAGTATTAGACAGACTAGTAATGGTTCAAGATTATCT
AGACGCGGGGTGGCATGTGCTGGATTTCCAGCTTTTTCTTGGTGCAGTGGTCTACAACGTGTAACCTGCTGGATGT
GCATTATTGGGCCGTGGTCATCATAGTCTACAAGGAAGTAGTAAAACTCTAGCCAACAAAAGTTAACTGGAAAAT
ACAAAATCTCAAAAATCCATCCAGTCTAACGAATTTACAAATCTTGGTACTAGACCTACACCACCTCCCAAACCT
GGTCCACTTATTGTGGAAGTATTTCTCACTAGAGGGACAAAAAGTGGTTTAGGATTCAGTATAACTGGTGGTATT
GGAAATGAAACAATCAATGGTGACTCAGGAATATTTGTAACCTAAGCTTACTCCTGGTGGTGTGCAGAGACAGAT
GGTCAATTCGTATTGGTGATAGAATTGTTCAAGTAAATGATGTACCACTAATTGATGTAACCTCATGAACAAGCT
GTCCGTGTTTTGAAACAAGCTGGTGATCAGGTTTCGACTTATTCTAGTAAAACATGTAAATAATTATTCATCACGT
CAAACCTTCGTCAACAGAAATAAAGACTGAATCAAGTGCAATTAATGATCAAGATGGAATTATTTGTAACAATGAT
TTCAGTGGTAAAAATAGTTATGAGGATAATGACGTTGGACCTACATGTTATGCTAAATCACGTTTCATCATCAGTA
TCTTTATCGTCAATTCGTGATCAGCTTCTTCTTCTCCTTCCACTTCATCTCATACATCTCCACTTTCAGAACCA
TCTGTACATAGTTCTTATCATGATGAATCATCATCCGGTCATCCAGTGGAGTCTGATATAAGTAAACAACAAGAA
CAAAATAAATATCAACAATCATCTTCTGTACTTTCACAATCAAAAACAAGATCGTAATTTATGTCATAACGATCAA
AATCATACTCATCATCGCCGTCAATCTGGGACTACAAAAAAGTCCATTCATCATCTGTAATACCTAATGAACGA
TATCGTTCTTACCAGATTTATCAAATGAAAAGTACCATAAATCACAACCTGACTAAAACCGTCACAACAACAAT
AATCCATGCTTTGGTTCAACTGGTCAAGAATTACTAGAAAATAGAATGGTTGGTATAATTGATTATGCAGCAGCT
GCTTCAGTGTCCAACCTTACTTAATGAATGGCCAAATGCTCGTCTAGTTACATTGTATCGAAGTGGTCGTAAACGA
ATTAATTCTATGAGTCGAAATCAAACGGATAATTCTGATATAATTCAACGTGGTTACTCATCAAATAGTGGAAGA

```

AACCTTGGTTTAAATATTGTTGGTGGTGATGGTTCAGAAGCAACATTTATTTCTCATATACAACCTGATAAACCG  
GCTGGTTTATCAAAAAGGATATTGGTTGGTGATCGATTGTTAACAGTTAATGGCATAGATGTCGCTAAGTATGGG  
CATGAGAAAGCGGCTGCAGCTTTACGAGATGCGCGTGATCGTGTGATCTTCTTCTAGTCTATAGTCCCTGAAGAA  
TATGCTAGTTTTGAGCAACATTTTCAGTCGTGAGCTTAAAGCAGTTGGTCATAAATTATCTTATAAATGCTTACAT  
TCACTGAAAGCTAAAACCTGCCAATAGAACAGGGATAGACGGTAAAGATAAAGGATCACCTATCACCAAGTTATCAA  
GATAAAAAGCAATCTGAAGTGAAGAAAGATGAGCTGAAACAAAAAACATAGAACATATTGATAAAAAACGGCAG  
AAACATCGTCAACAGAAGCAAAGGCGTCAACTTACGAATGAAGCACCTGGCGAAGAAGGAACACATGAAGAGAGT  
GACGCTAATGAATTGAGTAAATATCCTGATGTACTGTTATTACGCTGTCAAGTTGATTATGACCCAATGAAAGAA  
AATCATCACCAAACCTATACCTAAAAAAGTATTCAGTCTAAAGTCAGGTGATTGTTGTTATTAATACAATT  
GATCCTGAATGGTGGCAAGCTCGGAGATTGACCCAGAAATCAATGAACCAACTGGTCCAATCGGTCTAATTCCT  
AGTCGTTTACGCTTAGAAAGAAAAGAACGTACCAGGACACGTCATGTAAATTTTATGGCTAGAAACAGTCGATCT  
GTTGACACACCATCAATCAAATCAAATGATCCTTGTGAAAGACGAAGAAAAAAGAGAAACAATCATTGAAATCA  
TCTAACTCAACTCATTCTTTGGTGGAACTGTTAATCAATGTAAAGATTTTACTATTCAAAAAACAATACGATG  
AACAATAACTTTCCACGTAGTTCAAGAACTAAAAACCGCAGTGAATCTTCCCGTCGTCGTCATCGCGACCACCAA  
CATCATCCATTATCTTACATAGCTGTTACTCCAGTCCATTTAAGTTTTGCTAGACCTGTTGTTATACTAGGCTAT  
ATGAAGGATAGGATTGCTGATGAATTATTATGTGAATTTCTGATCTCTTCGGAACCGCTATCCCATATACAACCT  
CGACCACGTCGATCAAATGAAGTTGAAGGCCGTGACTATCATTGTAATCAGTCGAGAAATAATGGTTGCTGAT  
ATAGCTGCTCATAAATATCTTGAAGCTGGTGAATACAATGGAAATTTATATGGAACCCATTTAGATTCTGTATTT  
GAAGTGTCTGAATTAGGATTGCATTGCTTATTGGATGTTGGTGGGCCAGCATTAAAGCGTTTAGAATCGGCTGGA  
CTACCAGCAATCGCTATTCTTGTGCTACCTGAGACAATGCCGACTGATGAAACTGATAAAAAATGATGATGTCTAC  
GACGGTAATGATGATGATGGATCTTTTCCGCTTTTAAATGAACAAAGAAAGCAGAAAAAACTTAAACTTAAAAAG  
TGCTCTTCTGTTGAATCTGCAGCTTTTAAAAATTTACAAAGTAAACTTGGTCGTTTGTAGAGCATTTTACTTCC  
TTTTTGACAGCAATTATCACAACAGACGATTATGAAACAGCTTATAATCGTGTTAAAGAAATCATATTCACTAAT  
ACTGGACCTATTGTATGGTTGAATTCACCTCAACCAATACCATGA

>SmScrib: Smp\_104030.2

ATGTTTCATCTGAATGTTGATCAAAATCAACTGACTGAGTTACCCTCTGAGATTGGTCAATGTACATCACTCAAT  
ATTTTGTCTCTTCGAGAAATAATTTGCATAGATTACCCGATGAAATTGGTAATTGTACACGTTTACGAGTTTTG  
GATGTTTCTGGGAATAGACTTGATCGTTTACCATTACAGTTTATCAAGATGCTCATTTGACAGCTTTATGGCTTTCA  
CAGAATCAATCTCAACCAGTTATTACGTTGCAAAGAGATGTAGATCCTGTTACACAAGAACAGTATCTCATATGT  
TATTTACTACCACAGGATCAACTAGACTCACGTGTTGAAACTGATCCAACCTATGTCACCATCTGAATTAGATAGT  
TTTTCTGCTTCATTAAATGCTAACATGAAAACAAACCACGATTTACTTGATAATATCAGTGCTGAAATAAATCAT  
ACCTATGAGCCCGCAGATATGCATATATCAATTCCTCAATCAGATCTTTCAAAAATCGAAGTATTTACCGTCG  
AAATATGAATCGACTAAACCGT**CGACTTCACCATCATCAACACTGAATGATCATTAGCAATAACAAATGATCCT**  
**AATTCATTAAACAATCATCATTAGTTAATTCTACTACTAATCCTACAAAAAACTTACCATATTCAAATTCATCT**  
**ATTAATTCACCATCAAATGTAAATGGTAATTTAGATTCATCCTATACATCACCAAATCATATAAATGATCTTTCT**  
**ACCTCATCTGCACATTCATCTCTATCTATGCCAACATCTGCATCAACTCGTGTTCAATTTCTCTGGTTCAAGTAA**  
**CCTGATGAGATGGACAAATCAGGTTCCAAAGGATTTCCGAAAACACGTCATCCTCGTTCTGTAAAAAAGCCACG**  
**GATAATCATCTTATTAGTGGTAAAGATGATTCCAGTCAATGCAGAAGTGCCAATTTTCCTTCAAATACATTTCTGT**  
**GATGGCACCGGTTCTGCTAGCTCATCAGAATCTCTAAATGATGGAAGTGCTCCAATCTCACCGTCCGAATCACTA**  
**AATCATGATTGGAATTTCTCCGAAACCTATTGATTCTAATTTTAACTCTTCTGTTTATCCAAATCATATAATGAAA**  
**TCGAATGATGGGAGTTCTTTGGTGACTAACGATAATCTTATCTCGACCGAACCGACTGCCAAACCACGCAATAAA**  
**TCTCAAAATGTTACAGAAATATTTGGTAATAAACCTACTCAACCTTCTAATTTTCTCAATGAACACCCAGCGTCA**  
**AAATCTTCTACAGAAATAAGTAGACCTAAAATTCCTGGCGATACTACAATTAGGATGGCTTCTGTAGAAGATAAT**  
**TCAAATGCTCATTCCAATCGTGAATCTCCGATGAAAAAATTTCCCGATAATTTGGATGTACAAGGGAATCTTGAT**  
**GAGGACGCCTATAGCAGTGGAGGTGAAGAGATTTATGTTATTTCTAGACGAGTTGGGTTACAGATGATGTGGAA**  
**GATAATGAAGAGAAATCAAATCAAAAACCTTATTGACGTGATACACCACACTATACAAAACGCGCTCGAATTCAG**  
**TCAAAAACGGCTGATGGAATGGATAGTGAAGAAGCAGTATTAATAATATTAGAAAAATATCGAGCATCCGTTTCA**  
**CCGAATCCTGATTCAAATTCATTTGATTTTGACGGAGCTGTAAAACGATTTGCCTCCCCATTTGGTGGATTAAGT**

CCTCCTGATATCCCATTACAAAGTCGTGACTTGCATTCTCCATCATCCTTACATAAAACAACCTGTTGCCAGTTGT  
CAACAAGAACAAGTTGTAGTACACATCCATCGACAACCTAATGCTGGCTTAGGTCTTAGCGTAGCTGGTGGAGTT  
GGTTCAATACCATTTTCGTGGTTTAGATCATGGTATATTTGTTAGTCGATTAAATCCTACTGGATTAGCTGCCACT  
TCAGGACTTAAACTTGGCGATAAACTATTAGAGGTTAATGGTGTAGTCTTATCAATGTAGAACATCATGTCGCT  
GTGGCTACTTTACGTGCCAATACAAATGACTTCCGTATTCTGGTCGGTCGTGATATTCAAATGTCTACGAAAGCA  
GATAATTATAAGATTATCCCGTCTATGTTATCAGGAACAAATCTAAACATGTGCGACTCAATCATCACGAGTTACG  
GGAAGTATTAACACCAAAGAAATACCAGAATTTATTCACTGTACATTACAGCGAGATTTAAATGGTCTAGGATTT  
AGTATTGCCGGTGGTCAAGGCTCACTTCCTCCACCATTAGATAATGAAATAAACGGTGTGTGATATCAGAAACGCT  
CGTCACGATGAAGCCATTTTCGTTGTTAAACAAGTTCTAACGATTACAGTAGACTTGGAATTACTTCGTTATAATCCT  
GACATAAACGATAATCTCGGTAGTCTTCCGAAAACATCAGCAGCTAATGGTTTTATAACATCATCAATTCTGACA  
GTTAAAAGATCGAATAATCCACAAGATACTACAAAGGCTACAGATTTGACGGATACAGACAGTCATATTTCTGAG  
AAATGTGATTCTCGGGTTTACTTATATAGCGAAAAGGGTATTCTGTGGAAAGAATTACAGTTCGCAATGATGGT  
GGACCTTTAGGTTTAGCTATCTGTGGAGGATCCGATATAAGTTGTCTTCCGTTTGGTAACAAAGAACCAGGTATT  
TTTATATCTAAGATCTCCCTAGATGGCGCAGCTCTTAATACTGGCTTACGTATCGGAGATAGAGTGCTTAAAGTT  
AATGGAGTCGACTTGAGACACGCTACACATGATGAAGCGGTACAAGCTTTAATCCAGCCTGTAAAGAAGTACAG  
TTAGATGTACGCAGAGATCCTCCTCCACCAGGGCTAAGGCGTATCACTGTGACCAAACGACCTGGAGAACGATAT  
GGATTACGTGTTACAGGTGGACTTAACACTAGTGATAGTAACATGATAACTAATTTAGGATCACATTACTCATCA  
CTAGCCAATGATGACGGAATATTTGTTACATGGGTTTCACCAGATGGTGTCTATTGCTCGAGACGGCAGATTGAAG  
CCGGGTGATAGATTATTGGAGATCAATGGACATTGGTTAATGGGAGTTACTCTTGATGAAGTTCTGCATATATTT  
TGGGGATCCAAATCAACTCTGTCTATGTGTGGTATGCGATGGTCCAGTTGAATTCGCTCTCCAGATTAATAAAACG  
AACCATTACAGGGAACATTGAACCGTCTACATATTCTCCTGCGATGCCATTTTCTATCATACGCTCTACAATGCCA  
GAAATCGCTGATGCATCTGTGCGACGATAATCCTACCTCTAACTCACAATTAGATAAAGTAAACAGCACCCACAGA  
TTGAACTTAGAGGCTGCTGTACGTCATTAG

>SmLGL: Smp\_153310.1

ATGGCACAGAGGATCTTGAACCATTCCGAAAATTGCCCCACCAATTACAAAATCTTGAAATTGTCAAGCGAATA  
CATGATTACACACTTGGGAAACATACCGATAGTTACTCTTGTACCAGTCTTCTGCTTATGGATGTCCGGAGTCT  
CCAAGCGCTTTGGCTTTTTCGCAATTTCTTGGCTTATTAGCTATAGGAACAAGTAAAGGATTAGTAAAAATATAT  
GGCTCACCAGGCATTGTTTTCACTGTCCAACGAGAGGGTTCTCCGGTTATTTCTCTTTTGTCTTACCAGGTGAA  
GGGCGGATTGTTTTCGCTTCCGCTGACGGAACGTTAGATCTTTTTGAATTGGATTCTAGATGTGGACGGTGGTCA  
TCAACTAGCCGCGTCAAGGTTACAGCAAACCGGTGAACAGGATCTTATTACACGTATGTGTCTTGGTCATGGTGT  
ATTTACATCGGTTCTGCAAGCGGTACACTACGTCAAGTTGCGGTTAAAAACGGTCATATGACACTAGGAGATGAT  
GCACTCACTGCGTGTACAAGTTCAATTATCAGCGATAGTGTCCCCGTAGACAAGCGAGATCAACTTGGGGTAGAC  
TCTCCGATTATATCCCTTGAATTACAACCTCAAGGTAATCATCTGCTAATTGCATACGAGGGGGCTGTGTGGCA  
GTGGCTATTCTCAGCCTATTCCATTGGAAGCGTTACACAACAGCTGCTCCTGCAGATGTCACTGCTCCTACA  
GCTCAAGGGGAAGTTGTTACCCCAAACGTTGTTGATGAATTGGCCCCAACTATCCCTCAAGAACCTCAGGGCGAA  
GCAACACCAGGTGATAAAAGTGAAGTAAATGGAGAGAAGTCTCAGCCACTTTCAAACGACAGTGCTGTTGAGTCA  
ACTCCCAGTACTCCTGCTAAGGGACATTCCGAGAAGCGATCAACCTTAAAGCTTAAAGGCGTTAACACGTAGCTTG  
AGACCTGATGCGTCTAAAACAGAGAAAGAAGTCGAACCATCATTAACCTGTACCTCCAGCTCCTCGTATCAGTCAT  
TTACTGCTTTCGCGACCAACCGGTTGAATGGGCCTCATGGCGTGTACATCCGTAGATTCCCTTATCTACTGAAGTT  
GTAGTTCGCTTATGGTGATGGTGCATTTTCAGGTTTGGCCTATTGTTGCAGCTGTTAGTGATCAACCATTGAGCCA  
ATCATTGTATCAATGATAGATCCGCCAAACACTCCATATGGTCTCTACCTTGTGGTGCAATAAAAAAATATTG  
ATCAGTCCATCTGCAAATGCCGGTTTACTAACAGTGTTTTGTGGAGGTTTACCACGTCCCCAATTTGAGAATCGT  
TATGCAGTGTCTGTCTTACAGGATCATGAACATCATGTTTGTATCAGTTTGGATCAAAGGTATTGATTTTCGTA  
CTTGTAACCGAGTGAAGGGAGTGATCAAATGAAACGGTTTCAGGGGAAGTTGTGACTAAACCTTGTCCACCTAGT  
TATTCTGCTACATTATTAGTGCTTACTGAACGTGAACCTGTTGCTATTGATTTAACTCAACCCGATTGGCCTGTC  
TACGATTACCATATTTAAATTGTATGGATTTCACTCCGGTTACAGCTATAACTCACATAGGACAGGTTCCACCA  
GCCCTAATCCATCGGCTACATCAAGCTGCTCAGATAACTTCAGATGATATTACCAATTGTTTCATGGCCGATATGG  
GGCGGGTCTCATAATGGTAACAAGAATTTTTACAAAATCCTGGAAATGACGTTATTGTCCTTGGACATTCAAAAT



GGATGGGTTACTTTATGGGCAATTGGTCGAGCAGATACTACAATTCATCTGGGAACTTTACCAACATCATCTTTG  
TTTAATTTAACTGATTTGCAAAATGGTCAGCCTACCGAAGGTGTCCCTCATTATTGCACACCAACTGGACTAACA  
TTTCATCCCTGTCAGCTTATTCAATTAAATCCACCTAGCCAGATTACATCTCTTGCATTGGAGTTGTCTTGGAAT  
CTATTGGCCATTGGTTCTTCACACGGATTTGCTTTGTTAGACTTATTTGATCGTTCTATAATTCATGCTCATTTT  
ACTTATGATTCATCAGGTCCTGCAAAGATGGTTAATGCTGTGGCTAGTAAGTTGATCGTTGTATATGTGAACACA  
AGTCAGATTAATCCCAAACGTGTGACAGGGTTTGGCCTTCAGAATTTTACTTCTGGATCTGGAGAAAAACGCTAAA  
CTTGAATGGAATGCTGTTGCAACGCTGCTGGATGGACAGATTGCTGTACTGTCCTTGCCTAACCTTCGTAAAGTA  
TTCAAGGGAACGCTGTTATTCTGGTTATCTACCTTCATCCACACTTCCTTGTGTTGCCACGCGTACGTTTAA

## 6 Zusammenfassung

Der human- und tierpathogene Trematode *Schistosoma mansoni* besitzt eine nahezu einzigartige Reproduktionsbiologie, bei der es erst durch einen permanenten Paarungskontakt mit dem Männchen zur sexuellen Reifung des Weibchens kommt, eine Voraussetzung für die Eiproduktion und die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus. Grundlagen dieses Prozesses sind die Steigerung mitotischer Aktivität sowie die Initialisierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden in den weiblichen Reproduktionsorganen, die Differenzierungsprozesse steuern. Einige hoch konservierte Moleküle dieser Signalwege konnten bereits identifiziert und charakterisiert werden, darunter der Typ I-Rezeptor der TGF $\beta$ -Familie (SmT $\beta$ RI) und zelluläre Src-Tyrosinkinasen wie SmTK3. Erste funktionelle Studien *in vitro* mit spezifischen Inhibitoren für Typ I TGF $\beta$ -Rezeptoren (TRIKI) und Src-Kinasen (Herb A) zeigten einen Einfluss dieser Moleküle auf die mitotische Aktivität der Weibchen und die Oviposition. Ferner führte die Kombination beider Inhibitoren zu additiven Effekten dieser physiologischen Veränderungen, weshalb eine Kooperation beider Signalwege postuliert wurde. Eine Inhibierung der SmTK3 durch Herb A wurde bereits beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand eines Kinase-Assays gezeigt werden, dass TRIKI SmT $\beta$ RI im heterologen *Xenopus*-Oocyten-System inhibiert. Ferner wurden vergleichende Transkriptomstudien zur Identifizierung von differentiell regulierten Genen nach *in vitro* Behandlung adulter Schistosomenweibchen mit TRIKI bzw. Herb A (einzeln oder in Kombination) mit Hilfe von Microarrays durchgeführt. Dies führte zur Identifizierung einer Vielzahl an Genen, die unter gemeinsamer transkriptioneller Kontrolle der SmT $\beta$ RI- sowie Src-Kinasen-vermittelten Signalwege stehen. Diese Gene kodieren u.a. Signalmoleküle, Ca<sup>2+</sup>-assoziierte Proteine, Hsp- und Oberflächenproteine sowie darmassoziierte Moleküle. Die Transkriptionsänderungen wurden exemplarisch durch qPCR-Analysen bestätigt, wodurch ein weiterer und erster molekularer Hinweis für die Kooperation beider Signalwege erbracht wurde. Darüber hinaus deuteten die Daten auf einen stärkeren Einfluss des Src-Kinasensignalwegs auf die Regulation der Transkription.

Aufgrund der beschriebenen reduzierten Oviposition durch diese Inhibitoren *in vitro* lag ein Fokus weiterer Analysen auf der Untersuchung differentiell regulierter Gene, deren kodierte Proteine Funktionen bei der Eischalsynthese besitzen. Bei repräsentativ ausgewählten Genen wie den Eischalvorläufergenen p14 und p48 sowie dem SmTYR1-Gen, das für das schistosomale Eischalprotein-Vernetzungsenzym Tyrosinase 1 kodiert, konnte die modulierende Regulation der Transkription durch die kooperativ agierenden SmT $\beta$ RI- und Src-Kinase-Signalwege bestätigt werden. Dabei korrelierte die reduzierte Transkription mit der ebenfalls reduzierten Eiproduktion nach Herb A-, bzw. Kombinationsbehandlung.

Daneben offenbarten mikroskopische Untersuchungen der Morphologie inhibitor-behandelter adulter Würmer zum ersten Mal auch eine stark veränderte Gastrodermis nach Langzeitbehandlung (5-6 Tage) mit Herb A oder TRIKI/HerbA. Dieser Befund erklärt das Sterben der Würmer nach dieser Expositionsdauer.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden weiterführende funktionelle Studien für identifizierte Interaktionspartner der gonadenspezifisch exprimierten Kinasen SmTK3 und SmTK6 durchgeführt. Dabei konnte SmEps8 als häufigster und stärkster *upstream*-Interaktionspartner der SmTK3 charakterisiert werden. Bei SmEps8 handelt es sich um ein potientes EGFR-Substrat, dessen Interaktion mit EGFR-Molekülen aus *S. mansoni* (SER) untersucht wurde. Mit Hilfe von Y2H-Experimenten konnte eine schwache Bindung zwischen SmEps8 und den intrazellulären Bereichen von SER und SER2 detektiert werden. Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen wurde eine Koloaliation der Transkripte von SmTK3, SmEps8 und SER in Ovar und Vitellarium festgestellt, womit diese Ergebnisse auf eine putative SER-SmEps8-SmTK3-Signalkaskade in den Reproduktionsorganen des Weibchens hindeuten. In einer vorhergehenden Studie wurde bereits SmDLG als ein *upstream*-Interaktionspartner der Src-/Abl-Hybridkinase SmTK6 identifiziert. In *Drosophila melanogaster* bildet SmDLG einen Komplex mit den Proteinen Scrib und LGL, der u.a. Zellpolarität kontrolliert. Durch Datenbankanalysen konnten ähnliche Proteine dieser potentiellen Bindungspartner in *S. mansoni* identifiziert und im Weiteren kloniert werden (SmScrib und SmLGL). Anschließende Y2H-Versuche führten zu ersten Hinweisen für direkte Interaktionen dieser drei Moleküle. Schließlich wurden die Transkripte dieser Gene über *in situ*-Hybridisierungen hauptsächlich im Ovar detektiert. Diese Resultate deuten die Möglichkeit molekularer Interaktionen von SmTK6, SmDLG, SmScrib, und SmLGL an und geben einen ersten Hinweis auf eine Signalkaskade, die Zellpolarität in den Oocyten über eine Src-/Abl-Hybridkinase steuern könnte.

### Abstract

*Schistosoma mansoni* is a parasite and pathogenic for humans and animals. As members of the trematodes schistosomes show a nearly unique biology of reproduction, in which only a permanent pairing contact with the male leads to the sexual maturation of the female, a prerequisite for egg production and maintenance of the life cycle. The molecular basis of this process is the induction of mitotic activity and the initiation of different signal transduction cascades within the female reproductive organs. Some highly conserved members of these pathways were identified and characterised such as the type I receptor of the TGF $\beta$  family (SmT $\beta$ RI) and cellular tyrosine kinases like SmTK3. According to first functional *in vitro* studies with specific inhibitors of type I TGF $\beta$ -receptors (TRIKI) and Src kinases (Herbimycin A) an influence on mitotic activity and oviposition by both molecules was shown. By combining both inhibitors an additive effect of these physiological changes was observed, leading to the hypothesis of cooperating signalling pathways. The inhibition of SmTK3 by Herb A was shown previously.

In this thesis the inhibition of the schistosome T $\beta$ RI by TRIKI was demonstrated by a kinase assay using the heterologous *Xenopus* oocytes system. Furthermore, comparative transcriptome analyses were performed to identify differentially regulated genes following *in vitro* treatment of adult female schistosome with TRIKI and Herb A (separately or in combination) using microarrays. A huge number of genes were identified as transcriptionally controlled by SmT $\beta$ RI- as well as Src kinases-mediated signalling cascades. Amongst others, genes coding for signalling molecules, Ca<sup>2+</sup>-associated proteins, Hsps, surface proteins, and gut-associated molecules were detected. The transcriptional changes were validated exemplarily for selected genes, supporting the hypothesis of the cooperation of both pathways for the first time also at a molecular basis. Furthermore, the obtained data indicated a stronger influence of the Src kinase pathway for gene regulation.

Since the *in vitro* treatment with both inhibitors led to a reduced oviposition, one of the main objectives of the transcriptome analyses was the identification of genes, whose encoded proteins are involved in eggshell-formation. As representative candidates genes coding for the eggshell precursor proteins p14 and p48, as well as the SmTYR1 gene, which encodes the schistosomale tyrosinase 1, which is necessary for cross-linking eggshell proteins, were selected. The obtained results confirmed the modulating character of the cooperating SmT $\beta$ RI and Src-kinase pathways on the transcriptional regulation of these genes. These results correlated with the decreased egg production following the Herb A and combined treatment. Unexpectedly, the microscopical investigation of the morphology of treated adult worms revealed for the first time an additional deleterious effect on the

gastrodermis following long-time (5-6 days) treatment with Herb A or the combined inhibitors. This result explained death of these worms following this treatment period.

The second part of this thesis included functional studies of identified interaction partners of the gonad-expressed genes SmTK3 and SmTK6. SmEps8 was characterised as the most abundant and strongest *upstream* interaction-partner of SmTK3. Since SmEps8 is a potential substrate of EGFRs, the interaction of SmEps8 with EGFR homologues of *S. mansoni* (SERs) was investigated. Weak interactions of SmEps8 and the intracellular regions of SER and SER2 were detected by Y2H assays. According to *in situ* hybridisations SmTK3, SmEps8 and SER co-localised within the ovary and vitellarium, indicating a putative SER-SmEps8-SmTK3 signalling cascade within the reproductive organs of the female. In a previous study SmDLG was identified as an *upstream* interaction-partner of the Src/Abl hybrid-kinase SmTK6. In *Drosophila melanogaster* DLG interacts with Scrib and LGL in a complex, which controls cell polarity. Within the *S. mansoni* genome database homologous proteins were identified and subsequently cloned (SmScrib and SmLGL). First Y2H assays revealed direct interactions of these three molecules. Finally, *in situ* hybridisations localised the transcripts of these genes within the ovary. These findings point to the possibility of molecular interactions of SmTK6, SmDLG, SmScrib, and SmLGL, which is a first hint of a signalling cascade that may control cell polarity in oocytes via a Src/Abl hybrid-kinase.

## 7 Literaturverzeichnis

Agilent (2007) Two-color microarray-based gene expression analysis.

Ahier A, Rondard P, Gougnard N, Khayath N, Huang S, Trolet J, Donoghue DJ, Gauthier M, Pin JP, Dissous C (2009) A new family of receptor tyrosine kinases with a venus flytrap binding domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids. *PLoS One* **4**: e5651

Andrade LF, Nahum LA, Avelar LG, Silva LL, Zerlotini A, Ruiz JC, Oliveira G (2011) Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BMC genomics* **12**: 215

Armstrong JC (1965) Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *The Journal of Parasitology* **51**: 605-616

Armstrong RA, Slade SV, Eperjesi F (2000) An introduction to analysis of variance (ANOVA) with special reference to data from clinical experiments in optometry. *Ophthalmic Physiol Opt* **20**: 235-241

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* **25**: 25-29

Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA (2001) The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology* **122**: 329-338

Assémat E, Bazellères E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2008) Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1778**: 614-630

Avelar LG, Nahum LA, Andrade LF, Oliveira G (2011) Functional diversity of the *Schistosoma mansoni* tyrosine kinases. *Journal of Signal Transduction* **2011**: 603290

Badouel C, McNeill H (2009) Apical junctions and growth control in *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**: 755-760

Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **69**: 3613-3634

Barth LR, Fernandes AP, Rodrigues V (1996) Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **38**: 423-426

Basch PF (1981) Cultivation of *Schistosoma mansoni in vitro* I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *The Journal of Parasitology* **67**: 179-185

Beall MJ, McGonigle S, Pearce EJ (2000) Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF-beta signaling. *Molecular and Biochemical Parasitology* **111**: 131-142

- Beall MJ, Pearce EJ (2001) Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine/threonine kinase from the intravascular parasite *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 31613-31619
- Beckmann S, Buro C, Dissous C, Hirzmann J, Grevelding CG (2010b) The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathogens* **6**: e1000769
- Beckmann S, Grevelding CG (2010c) Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. *International Journal for Parasitology* **40**: 521-526
- Beckmann S, Hahnel S, Cailliau K, Vanderstraete M, Browaeys E, Dissous C, Grevelding CG (2011) Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 42325-42336
- Beckmann S, Leutner S, Gougnard N, Dissous C, Grevelding CG (2012a) Protein kinases as potential targets for novel anti-schistosomal strategies. *Current Pharmaceutical Design* **18**: 3579-3594
- Beckmann S, Quack T, Burmeister C, Buro C, Long T, Dissous C, Grevelding CG (2010a) *Schistosoma mansoni*: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. *Parasitology* **137**: 497-520
- Beckmann S, Quack T, Dissous C, Cailliau K, Lang G, Grevelding CG (2012b) Discovery of platyhelminth-specific alpha/beta-integrin families and evidence for their role in reproduction in *Schistosoma mansoni*. *PloS One* **7**: e52519
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research* **125**: 279-284
- Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Pertea M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM (2009) The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* **460**: 352-358
- Biesova Z, Piccoli C, Wong WT (1997) Isolation and characterization of e3B1, an eps8 binding protein that regulates cell growth. *Oncogene* **14**: 233-241
- Bilder D, Li M, Perrimon N (2000) Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* **289**: 113-116
- BioTeach (2008) The yeast two hybrid assay-an exercise in experimental eloquence. [www.bioteach.ubc.ca](http://www.bioteach.ubc.ca)
- Blagosklonny MV (2002) Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia* **16**: 455-462

- Blanchard TJ (2004) Schistosomiasis. *Travel Medicine and Infectious Disease* **2**: 5-11
- Boggon TJ, Eck MJ (2004) Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **23**: 7918-7927
- Bosshardt SC, Damian RT (1986) Serum factors from infected baboons inhibit oviposition and cause unpairing of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *The Journal of Parasitology* **72**: 583-587
- Bostic JR, Strand M (1996) Molecular cloning of a *Schistosoma mansoni* protein expressed in the gynecophoral canal of male worms. *Molecular and Biochemical Parasitology* **79**: 79-89
- Breeden L, Nasmyth K (1985) Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **50**: 643-650
- Brindley PJ, Mitreva M, Ghedin E, Lustigman S (2009) Helminth genomics: The implications for human health. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**: e538
- Browaeys-Poly E, Cailliau K, Vilain JP (2000) Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma. *European journal of biochemistry/FEBS* **267**: 6256-6263
- Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U (2009) Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 2763-2788
- Carlo JM, Osman A, Niles EG, Wu W, Fantappie MR, Oliveira FM, LoVerde PT (2007) Identification and characterization of an R-Smad ortholog (SmSmad1B) from *Schistosoma mansoni*. *The FEBS Journal* **274**: 4075-4093
- Castagnino P, Biesova Z, Wong WT, Fazioli F, Gill GN, Di Fiore PP (1995) Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent. *Oncogene* **10**: 723-729
- Chen LL, Rekosh DM, LoVerde PT (1992) *Schistosoma mansoni* p48 eggshell protein gene: characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**: 39-52
- Cheng G, Fu Z, Lin J, Shi Y, Zhou Y, Jin Y, Cai Y (2009) *In vitro* and *in vivo* evaluation of small interference RNA-mediated gynaecophoral canal protein silencing in *Schistosoma japonicum*. *The Journal of Gene Medicine* **11**: 412-421
- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L (2000) The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* **77**: 41-51
- Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S (1995) Antischistosomal drugs: past, present ... and future? *Pharmacology & Therapeutics* **68**: 35-85
- Clontech (2002) Yeast protocols handbook. [www.clontech.com](http://www.clontech.com)
- Cogswell AA, Kommer VP, Williams DL (2012) Transcriptional analysis of a unique set of genes involved in *Schistosoma mansoni* female reproductive biology. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**: e1907



- Copeland CS, Marz M, Rose D, Hertel J, Brindley PJ, Santana CB, Kehr S, Attolini CS, Stadler PF (2009) Homology-based annotation of non-coding RNAs in the genomes of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics* **10**: 464
- Croce A, Cassata G, Disanza A, Gagliani MC, Tacchetti C, Malabarba MG, Carlier MF, Scita G, Baumeister R, Di Fiore PP (2004) A novel actin barbed-end-capping activity in EPS-8 regulates apical morphogenesis in intestinal cells of *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology* **6**: 1173-1179
- Dai K, Liao S, Zhang J, Zhang X, Tu X (2011) Solution structure of tensin2 SH2 domain and its phosphotyrosine-independent interaction with DLC-1. *PLoS One* **6**: e21965
- Davies SJ, Shoemaker CB, Pearce EJ (1998) A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 11234-11240
- De Bont J, Vercruysse J (1998) Schistosomiasis in cattle. *Advances in Parasitology* **41**: 285-364
- Den Hollander JE, Erasmus DA (1984) *Schistosoma mansoni*: DNA synthesis in males and females from mixed and single-sex infections. *Parasitology* **88** ( Pt 3): 463-476
- Den Hollander JE, Erasmus DA (1985) *Schistosoma mansoni*: male stimulation and DNA synthesis by the female. *Parasitology* **91** ( Pt 3): 449-457
- Dettman CD, Higgins-Opitz SB, Saikoolal A (1989) Enhanced efficacy of the paddling method for schistosome infection of rodents by a four-step pre-soaking procedure. *Parasitology Research* **76**: 183-184
- deWalick S, Bexkens ML, van Balkom BW, Wu YP, Smit CH, Hokke CH, de Groot PG, Heck AJ, Tielens AG, van Hellemond JJ (2011) The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. *International Journal for Parasitology* **41**: 523-532
- Di Fiore PP, Scita G (2002) Eps8 in the midst of GTPases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**: 1178-1183
- Dinh HK, Stavchansky S, Schuschereba ST, Stuck BE, Bowman PD (2002) Cytoprotection against thermal injury: evaluation of herbimycin A by cell viability and cDNA arrays. *The Pharmacogenomics Journal* **2**: 318-326
- Disanza A, Carlier MF, Stradal TE, Didry D, Frittoli E, Confalonieri S, Croce A, Wehland J, Di Fiore PP, Scita G (2004) Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. *Nature Cell Biology* **6**: 1180-1188
- Dissous C, Ahier A, Khayath N (2007) Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **29**: 1281-1288
- Dissous C, Grevelding CG (2011) Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? *Trends in Parasitology* **27**: 59-66

- Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattoccia L, Botros S, Coles G, Tchuente LA, Mbaye A, Engels D (2009) Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* **136**: 1825-1835
- Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D (2002) Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **96**: 465-469
- Dollar GL, Weber U, Mlodzik M, Sokol SY (2005) Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled. *Nature* **437**: 1376-1380
- Dorak MT (2008) Real-time PCR. *Taylor & Francis* pp. 58-62
- Duvall RH, DeWitt WB (1967) An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **16**: 483-486
- el Ridi R, Ozaki T, Inaba T, Ito M, Kamiya H (1997) *Schistosoma mansoni* oviposition *in vitro* reflects worm fecundity *in vivo*: individual-, parasite age- and host-dependent variations. *International Journal for Parasitology* **27**: 381-387
- Erasmus DA (1973) A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **67**: 165-183
- Erasmus DA, Popiel I, Shaw JR (1982) A comparative study of the vitelline cell in *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* and *S. mattheei*. *Parasitology* **84**: 283-287
- Farivar RS, Gardner-Thorpe J, Ito H, Arshad H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2003) The efficacy of tyrosine kinase inhibitors on human pancreatic cancer cell lines. *The Journal of Surgical Research* **115**: 219-225
- Fazioli F, Minichiello L, Matòská V, Castagnino P, Miki T, Wong WT, Di Fiore PP (1993) Eps8, a substrate for the epidermal growth factor receptor kinase, enhances EGF-dependent mitogenic signals. *The EMBO Journal* **12**: 3799-3808
- Fenwick A, Webster JP (2006) Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases* **19**: 577-582
- Fields S, Sternglanz R (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics : TIG* **10**: 286-292
- Fire AZ (2007) Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death and Differentiation* **14**: 1998-2012
- Fitzpatrick JM, Hirai Y, Hirai H, Hoffmann KF (2007) Schistosome egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**: 823-835
- Fitzpatrick JM, Hoffmann KF (2006) Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. *International Journal for Parasitology* **36**: 1081-1089

- Forman-Kay JD, Pawson T (1999) Diversity in protein recognition by PTB domains. *Current Opinion in Structural Biology* **9**: 690-695
- Forrest AR, Abdelhamid RF, Carninci P (2009) Annotating non-coding transcription using functional genomics strategies. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **8**: 437-443
- Forrester SG, Warfel PW, Pearce EJ (2004) Tegumental expression of a novel type II receptor serine/threonine kinase (SmRK2) in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **136**: 149-156
- Freitas TC, Jung E, Pearce EJ (2007) TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens* **3**: e52
- Freitas TC, Jung E, Pearce EJ (2009) A bone morphogenetic protein homologue in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* **39**: 281-287
- Froldi F, Ziosi M, Tomba G, Parisi F, Garoia F, Pession A, Grifoni D (2008) *Drosophila* lethal giant larvae neoplastic mutant as a genetic tool for cancer modeling. *Current Genomics* **9**: 147-154
- Fukazawa H, Li PM, Yamamoto C, Murakami Y, Mizuno S, Uehara Y (1991) Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A *in vitro*. *Biochemical Pharmacology* **42**: 1661-1671
- Galanti SE, Huang SC, Pearce EJ (2012) Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**: e1509
- Gallo R, Provenzano C, Carbone R, Di Fiore PP, Castellani L, Falcone G, Alemà S (1997) Regulation of the tyrosine kinase substrate Eps8 expression by growth factors, v-Src and terminal differentiation. *Oncogene* **15**: 1929-1936
- Gönnert R (1955) Schistosomiasis studies. I. Contributions to the anatomy and histology of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* **6**: 18-33
- Gougnard N, Vanderstraete M, Cailliau K, Lescuyer A, Browaeys E, Dissous C (2012) *Schistosoma mansoni*: structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. *Experimental Parasitology* **132**: 32-39
- Greenberg RM (2005) Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *International Journal for Parasitology* **35**: 1-9
- Grevelding CG (1995) The female-specific W1 sequence of the Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* occurs in both genders of a Liberian strain. *Molecular and Biochemical Parasitology* **71**: 269-272
- Grevelding CG, Sommer G, Kunz W (1997) Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitology* **115** ( Pt 6): 635-640
- Grossmann S, Bauer S, Robinson PN, Vingron M (2007) Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent child analysis. *Bioinformatics* **23**: 3024-3031

- Gupta BC, Basch PF (1987) Evidence for transfer of a glycoprotein from male to female *Schistosoma mansoni* during pairing. *The Journal of Parasitology* **73**: 674-675
- Haccard O, Lewellyn A, Hartley RS, Erikson E, Maller JL (1995) Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Developmental Biology* **168**: 677-682
- Haddad F, Qin AX, Giger JM, Guo H, Baldwin KM (2007) Potential pitfalls in the accuracy of analysis of natural sense-antisense RNA pairs by reverse transcription-PCR. *BMC Biotechnology* **7**: 21
- Hagan P (2009) Schistosomiasis - a rich vein of research. *Parasitology* **136**: 1611-1619
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* **418**: 244-251
- Harris BZ, Lim WA (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of Cell Science* **114**: 3219-3231
- He YX, Salafsky B, Ramaswamy K (2001) Host-parasite relationships of *Schistosoma japonicum* in mammalian hosts. *Trends in Parasitology* **17**: 320-324
- Henkle-Dührsen K, Kampkötter A (2001) Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **114**: 129-142
- Hough CD, Woods DF, Park S, Bryant PJ (1997) Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs large. *Genes & Development* **11**: 3242-3253
- Huang JH, Rajkovic A, Szafranski P, Ochsner S, Richards J, Goode S (2003) Expression of *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes discslarge, scribble, and lethal giant larvae in the mammalian ovary. *Gene Expression Patterns: GEP* **3**: 3-11
- Huang SC, Freitas TC, Amiel E, Everts B, Pearce EL, Lok JB, Pearce EJ (2012) Fatty acid oxidation is essential for egg production by the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens* **8**: e1002996
- Hubbard SR, Till JH (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry* **69**: 373-398
- Humbert P, Russell S, Richardson H (2003) Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **25**: 542-553
- Huse M, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J (1999) Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* **96**: 425-436
- Hwang PM, Li C, Morra M, Lillywhite J, Muhandiram DR, Gertler F, Terhorst C, Kay LE, Pawson T, Forman-Kay JD, Li SC (2002) A "three-pronged" binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain: structural basis and relevance to the XLP syndrome. *The EMBO Journal* **21**: 314-323
- James P, Halladay J, Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436

- Jones M (2001) Isolation of plasmid DNA from yeast using the QIAprep Spin Miniprep Kit. User-Developed-Protocols. [www.QIAGEN.com](http://www.QIAGEN.com)
- Kallay LM, McNickle A, Brennwald PJ, Hubbard AL, Braiterman LT (2006) Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains. *Journal of Cellular Biochemistry* **99**: 647-664
- Kampkötter A, Ridgers I, Johnston DA, Rollinson D, Kunz W, Grevelding CG (1999) *Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of the Ras homologue. *Experimental Parasitology* **91**: 280-283
- Kang M, Choi S, Jeong SJ, Lee SA, Kwak TK, Kim H, Jung O, Lee MS, Ko Y, Ryu J, Choi YJ, Jeong D, Lee HJ, Ye SK, Kim SH, Lee JW (2012) Cross-talk between TGFbeta1 and EGFR signalling pathways induces TM4SF5 expression and epithelial-mesenchymal transition. *The Biochemical Journal* **443**: 691-700
- Kapp K, Knobloch J, Schüssler P, Sroka S, Lammers R, Kunz W, Grevelding CG (2004) The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Molecular and Biochemical Parasitology* **138**: 171-182
- Kapp K, Schüssler P, Kunz W, Grevelding CG (2001) Identification, isolation and characterization of a Fyn-like tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **122**: 317-327
- Kasai S, Kikuchi H (2010) The inhibitory mechanisms of the tyrosine kinase inhibitors herbimycin a, genistein, and tyrphostin B48 with regard to the function of the aryl hydrocarbon receptor in Caco-2 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 36-43
- Katoh M, Katoh M (2004) Identification and characterization of human GUKH2 gene *in silico*. *International Journal of Oncology* **24**: 1033-1038
- Kaushal D, Naeve CW (2004) Analyzing and visualizing expression data with Spotfire. *Current protocols in Bioinformatics* **Chapter 7**: Unit 7.9
- Kaushal D, Naeve CW (2005) An overview of Spotfire for gene-expression studies. *Current Protocols in Human Genetics* **Chapter 11**: Unit 11.19
- Khayath N, Vicogne J, Ahier A, BenYounes A, Konrad C, Trolet J, Viscogliosi E, Brehm K, Dissous C (2007) Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *The FEBS Journal* **274**: 659-676
- Kishan KV, Scita G, Wong WT, Di Fiore PP, Newcomer ME (1997) The SH3 domain of Eps8 exists as a novel intertwined dimer. *Nature structural biology* **4**: 739-743
- Knippers R (2001) Molekulare Genetik. *Stuttgart: Thieme* 8., neubearb. Aufl. edn.
- Knobloch J, Beckmann S, Burmeister C, Quack T, Grevelding CG (2007) Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Experimental parasitology* **117**: 318-336
- Knobloch J, Kunz W, Grevelding CG (2002b) Quantification of DNA synthesis in multicellular organisms by a combined DAPI and BrdU technique. *Development, Growth & Differentiation* **44**: 559-563

- Knobloch J, Kunz W, Grevelding CG (2006) Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* **36**: 1261-1272
- Knobloch J, Rossi A, Osman A, LoVerde PT, Klinkert MQ, Grevelding CG (2004) Cytological and biochemical evidence for a gonad-preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbetaR-I in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **138**: 227-236
- Knobloch J, Winnen R, Quack M, Kunz W, Grevelding CG (2002a) A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* **294**: 87-97
- Köster B, Dargatz H, Schröder J, Hirzmann J, Haarmann C, Symmons P, Kunz W (1988) Identification and localisation of the products of a putative eggshell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **31**: 183-198
- Krauss G (2008) Biochemistry of signal transduction and regulation. *Weinheim: Wiley-VCH Verl.* 4., enl. and improved edn.
- Krautz-Peterson G, Bhardwaj R, Faghiri Z, Tararam CA, Skelly PJ (2010) RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. *Parasitology* **137**: 485-495
- Krautz-Peterson G, Radwanska M, Ndegwa D, Shoemaker CB, Skelly PJ (2007) Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference. *Molecular and Biochemical Parasitology* **153**: 194-202
- Kunz W (2001) Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends in Parasitology* **17**: 227-231
- Kunz W, Gohr L, Grevelding C, Schüssler P, Sommer G, Menrath M, Michel A (1995) *Schistosoma mansoni*: control of female fertility by the male. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**: 185-189
- Lambert CC (2011) Signaling pathways in ascidian oocyte maturation: the roles of cAMP/Epac, intracellular calcium levels, and calmodulin kinase in regulating GVBD. *Molecular Reproduction and Development* **78**: 726-733
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* **40**: D302-305
- Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ, Southgate VR (2001) *In vitro* responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *International Journal for Parasitology* **31**: 1227-1235
- Long T, Cailliau K, Beckmann S, Browaeys E, Trolet J, Grevelding CG, Dissous C (2010) *Schistosoma mansoni* Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. *International Journal for Parasitology* **40**: 1075-1086
- LoVerde PT (2002) Presidential address. Sex and schistosomes: an interesting biological interplay with control implications. *The Journal of Parasitology* **88**: 3-13
- LoVerde PT, Andrade LF, Oliveira G (2009) Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 422-428

- Loverde PT, Osman A, Hinck A (2007) *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. *Experimental Parasitology* **117**: 304-317
- Lucius R, Loos-Frank B (1997) Parasitologie : Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*
- Maa MC, Lai JR, Lin RW, Leu TH (1999) Enhancement of tyrosyl phosphorylation and protein expression of eps8 by v-Src. *Biochimica et Biophysica Acta* **1450**: 341-351
- Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC (1998) Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **93 Suppl 1**: 303-307
- Marcette J, Hood IV, Johnston CA, Doe CQ, Prehoda KE (2009) Allosteric control of regulated scaffolding in membrane-associated guanylate kinases. *Biochemistry* **48**: 10014-10019
- Massagué J (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**: 169-178
- Matchmaker (2001) Library construction & screening kit user manual.
- Mathew D, Gramates LS, Packard M, Thomas U, Bilder D, Perrimon N, Gorczyca M, Budnik V (2002) Recruitment of scribble to the synaptic scaffolding complex requires GUK-holder, a novel DLG binding protein. *Current Biology: CB* **12**: 531-539
- Matòsková B, Wong WT, Nomura N, Robbins KC, Di Fiore PP (1996) RN-tre specifically binds to the SH3 domain of eps8 with high affinity and confers growth advantage to NIH3T3 upon carboxy-terminal truncation. *Oncogene* **12**: 2679-2688
- McClelland M, Nelson M (1992) Effect of site-specific methylation on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research* **20 Suppl**: 2145-2157
- McGonigle S, Beall MJ, Pearce EJ (2002) Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF beta receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF beta response. *Biochemistry* **41**: 579-587
- Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, Mutuku MW, Karanja DM, Colley DG, Black CL, Secor WE, Mkoji GM, Loker ES (2009) Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**: e504
- Meyer F, Meyer H, Bueding E (1970) Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochimica et Biophysica Acta* **210**: 257-266
- Michaels RM (1969) Mating of *Schistosoma mansoni* in vitro. *Experimental Parasitology* **25**: 58-71
- Michel A, Knobloch J, Kunz W (2003) P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. *Parasitology* **127**: 519-524

- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory*
- Miller JH (1992) A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Mohrmann L, Verrijzer CP (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1681**: 59-73
- Mongioví AM, Romano PR, Panni S, Mendoza M, Wong WT, Musacchio A, Cesareni G, Di Fiore PP (1999) A novel peptide-SH3 interaction. *The EMBO Journal* **18**: 5300-5309
- Moore DV, Sandground JH (1956) The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **5**: 831-840
- Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM (2006) Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online* **8**: 175-193
- Moustakas A, Heldin CH (2009) The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**: 3699-3714
- Mueller TD, Nickel J (2012) Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Letters* **586**: 1846-1859
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-273
- Myers JL, Well A (2003) Research design and statistical analysis, 2. edn. New York, NY Psychology Press
- Nawaratna SS, McManus DP, Moertel L, Gobert GN, Jones MK (2011) Gene Atlasing of digestive and reproductive tissues in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**: e1043
- Ndegwa D, Krautz-Peterson G, Skelly PJ (2007) Protocols for gene silencing in schistosomes. *Experimental Parasitology* **117**: 284-291
- Neves RH, de Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, Lenzi HL, Hulstijn M, Gomes DC (2005) A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitology Research* **95**: 43-49
- New England Biolabs (2008) NEB 10-beta competent *E. coli* (high efficiency)-manual. [www.neb.com](http://www.neb.com)
- Newport GR, Weller TH (1982) Deposition and maturation of eggs of *Schistosoma mansoni* *in vitro*: importance of fatty acids in serum-free media. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **31**: 349-357



- Offenhäuser N, Borgonovo A, Disanza A, Romano P, Ponzanelli I, Iannolo G, Di Fiore PP, Scita G (2004) The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway. *Molecular Biology of The Cell* **15**: 91-98
- Ogunjimi AA, Zeqiraj E, Ceccarelli DF, Sicheri F, Wrana JL, David L (2012) Structural basis for specificity of TGFbeta family receptor small molecule inhibitors. *Cellular Signalling* **24**: 476-483
- Oliveira KC, Carvalho ML, Maracaja-Coutinho V, Kitajima JP, Verjovski-Almeida S (2011) Non-coding RNAs in schistosomes: an unexplored world. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **83**: 673-694
- Oliveira KC, Carvalho ML, Venancio TM, Miyasato PA, Kawano T, DeMarco R, Verjovski-Almeida S (2009) Identification of the *Schistosoma mansoni* TNF-alpha receptor gene and the effect of human TNF-alpha on the parasite gene expression profile. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**: e556
- Oliveira KC, Carvalho ML, Verjovski-Almeida S, LoVerde PT (2012) Effect of human TGF-beta on the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology* **183**: 132-139
- Omura S, Iwai Y, Takahashi Y, Sadakane N, Nakagawa A, Oiwa H, Hasegawa Y, Ikai T (1979) Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of Streptomyces. *The Journal of Antibiotics* **32**: 255-261
- Osborne MA, Dalton S, Kochan JP (1995) The yeast tribrid system-genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Biotechnology (N Y)* **13**: 1474-1478
- Osman A, Niles EG, LoVerde PT (2001) Identification and characterization of a Smad2 homologue from *Schistosoma mansoni*, a transforming growth factor-beta signal transducer. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 10072-10082
- Osman A, Niles EG, LoVerde PT (2004) Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4: role in Erk-mediated transforming growth factor beta (TGF-beta) down-regulation. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 6474-6486
- Osman A, Niles EG, Verjovski-Almeida S, LoVerde PT (2006) *Schistosoma mansoni* TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathogens* **2**: e54
- Parker-Manuel SJ, Ivens AC, Dillon GP, Wilson RA (2011) Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**: e1274
- Pearson HB, Perez-Mancera PA, Dow LE, Ryan A, Tennstedt P, Bogani D, Elsum I, Greenfield A, Tuveson DA, Simon R, Humbert PO (2011) SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *The Journal of Clinical Investigation* **121**: 4257-4267

- Philipp C (2004) Suche nach Interaktionspartnern der Tyrosinkinase TK3 aus *Schistosoma mansoni* und Experimente zur funktionellen Inhibierung verschiedener Gene. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- Popiel I, Basch PF (1984) Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *The Journal of Experimental Zoology* **232**: 141-150
- Popiel I, Cioli D, Erasmus DA (1984) The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *International Journal for Parasitology* **14**: 183-190
- Protasio AV, Tsai IJ, Babbage A, Nichol S, Hunt M, Aslett MA, De Silva N, Velarde GS, Anderson TJ, Clark RC, Davidson C, Dillon GP, Holroyd NE, LoVerde PT, Lloyd C, McQuillan J, Oliveira G, Otto TD, Parker-Manuel SJ, Quail MA, Wilson RA, Zerlotini A, Dunne DW, Berriman M (2012) A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**: e1455
- Provenzano C, Gallo R, Carbone R, Di Fiore PP, Falcone G, Castellani L, Alemà S (1998) Eps8, a tyrosine kinase substrate, is recruited to the cell cortex and dynamic F-actin upon cytoskeleton remodeling. *Experimental cell research* **242**: 186-200
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**: 679-684
- QIAGEN (2001) QIAGEN PCR cloning handbook. [www.QIAGEN.com](http://www.QIAGEN.com)
- Qian Y, Prehoda KE (2006) Interdomain interactions in the tumor suppressor discs large regulate binding to the synaptic protein GukHolder. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 35757-35763
- Quack T, Beckmann S, Grevelding CG (2006) Schistosomiasis and the molecular biology of the male-female interaction of *S. mansoni*. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **119**: 365-372
- Quack T, Knobloch J, Beckmann S, Vicogne J, Dissous C, Grevelding CG (2009) The formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK and the GTPase SmRho1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*. *PloS One* **4**: e6998
- Quackenbush J (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics* **32 Suppl**: 496-501
- Ramachandran H, Skelly PJ, Shoemaker CB (1996) The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Molecular and Biochemical Parasitology* **83**: 1-10
- Reis MG, Kuhns J, Blanton R, Davis AH (1989) Localization and pattern of expression of a female specific mRNA in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **32**: 113-119

- Robinson PN, Wollstein A, Böhme U, Beattie B (2004) Ontologizing gene-expression microarray data: characterizing clusters with Gene Ontology. *Bioinformatics* **20**: 979-981
- Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP (2002) Schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine* **346**: 1212-1220
- Rossi A, Pica-Mattoccia L, Cioli D, Klinkert MQ (2002) Rapamycin insensitivity in *Schistosoma mansoni* is not due to FKBP12 functionality. *Molecular and Biochemical Parasitology* **125**: 1-9
- Rychlik W, Rhoads RE (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **17**: 8543-8551
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning : A laboratory manual: Vol. 2. *Cold Spring Harbor* 2. ed edn.
- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011) TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* **121**: 233-251
- Savioli L, Renganathan E, Montresor A, Davis A, Behbehani K (1997) Control of schistosomiasis-a global picture. *Parasitol Today* **13**: 444-448
- Sawyer JS, Anderson BD, Beight DW, Campbell RM, Jones ML, Herron DK, Lampe JW, McCowan JR, McMillen WT, Mort N, Parsons S, Smith EC, Vieth M, Weir LC, Yan L, Zhang F, Yingling JM (2003) Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted pyrazole inhibitors of the transforming growth factor-beta type I receptor kinase domain. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**: 3953-3956
- Scherer A, Graff JM (2000) Calmodulin differentially modulates Smad1 and Smad2 signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 41430-41438
- Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium (2009) The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature* **460**: 345-351
- Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-225
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5857-5864
- Scita G, Tenca P, Arecas LB, Tocchetti A, Frittoli E, Giardina G, Ponzanelli I, Sini P, Innocenti M, Di Fiore PP (2001) An effector region in Eps8 is responsible for the activation of the Rac-specific GEF activity of Sos-1 and for the proper localization of the Rac-based actin-polymerizing machine. *The Journal of Cell Biology* **154**: 1031-1044
- Seibt W (2003) Physik für Mediziner. *Stuttgart: Thieme* 5., unveränd. Aufl. edn.
- Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685-700

- Shoemaker CB, Ramachandran H, Landa A, dos Reis MG, Stein LD (1992) Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology* **53**: 17-32
- Short RB, Grossman AI (1981) Conventional giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. *The Journal of Parasitology* **67**: 661-671
- Silva CL, Mendonca-Silva DL, Noel F (1998) Evidence for functional ryanodine receptors in *Schistosoma mansoni* and their putative role in the control of calcium homeostasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **93 Suppl 1**: 269-270
- Singh J, Chuaqui CE, Boriack-Sjodin PA, Lee WC, Pontz T, Corbley MJ, Cheung HK, Arduini RM, Mead JN, Newman MN, Papadatos JL, Bowes S, Josiah S, Ling LE (2003) Successful shape-based virtual screening: the discovery of a potent inhibitor of the type I TGFbeta receptor kinase (TbetaRI). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**: 4355-4359
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, Neel BG, Birge RB, Fajardo JE, Chou MM, Hanafusa H, Schaffhausen B, Cantley LC (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**: 767-778
- Stefanić S, Dvořák J, Horn M, Braschi S, Sojka D, Ruelas DS, Suzuki B, Lim KC, Hopkins SD, McKerrow JH, Caffrey CR (2010) RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. *PLoS Neglected Tropical diseases* **4**: e850
- Stetak A, Hoier EF, Croce A, Cassata G, Di Fiore PP, Hajnal A (2006) Cell fate-specific regulation of EGF receptor trafficking during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *The EMBO Journal* **25**: 2347-2357
- Superti-Furga G, Courtneidge SA (1995) Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **17**: 321-330
- Takahashi K, Suzuki K, Uehara Y, Ono T (1992) Growth inhibition by anchorage-deficiency is associated with increased level but reduced phosphorylation of mutant p53. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* **83**: 358-365
- Thomas S, Bonchev D (2010) A survey of current software for network analysis in molecular biology. *Human Genomics* **4**: 353-360
- Thomas SM, Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 513-609
- Tocchetti A, Confalonieri S, Scita G, Di Fiore PP, Betsholtz C (2003) *In silico* analysis of the EPS8 gene family: genomic organization, expression profile, and protein structure. *Genomics* **81**: 234-244
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 5116-5121

- Uehara Y, Fukazawa H, Murakami Y, Mizuno S (1989a) Irreversible inhibition of v-src tyrosine kinase activity by herbimycin A and its abrogation by sulfhydryl compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **163**: 803-809
- Uehara Y, Murakami Y, Sugimoto Y, Mizuno S (1989b) Mechanism of reversion of Rous sarcoma virus transformation by herbimycin A: reduction of total phosphotyrosine levels due to reduced kinase activity and increased turnover of p60v-src1. *Cancer Research* **49**: 780-785
- Van Crielinge W, Beyaert R (1999) Yeast two-hybrid: state of the art. *Biological Procedures Online* **2**: 1-38
- Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimarães PE, Ojopi EP, Paquola AC, Piazza JP, Nishiyama MY, Jr., Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregorio SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento AL, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sá RG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menck CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E (2003) Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetics* **35**: 148-157
- Verjovski-Almeida S, Venancio TM, Oliveira KC, Almeida GT, DeMarco R (2007) Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. *Experimental Parasitology* **117**: 236-245
- Vermeire JJ, Osman A, LoVerde PT, Williams DL (2003) Characterisation of a Rho homologue of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* **33**: 721-731
- Vicogne J, Cailliau K, Tulasne D, Browaeys E, Yan YT, Fafeur V, Vilain JP, Legrand D, Trolet J, Dissous C (2004) Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 37407-37414
- Vicogne J, Pin JP, Lardans V, Capron M, Noël C, Dissous C (2003) An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**: 51-62
- Vieira V, de la Houssaye G, Lacassagne E, Dufier JL, Jaïs JP, Beermann F, Menasche M, Abitbol M (2008) Differential regulation of Dlg1, Scrib, and Lgl1 expression in a transgenic mouse model of ocular cancer. *Molecular Vision* **14**: 2390-2403
- Vogt J, Traynor R, Sapkota GP (2011) The specificities of small molecule inhibitors of the TGF $\beta$  and BMP pathways. *Cellular Signalling* **23**: 1831-1842
- von Bubnoff A, Cho KW (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Developmental Biology* **239**: 1-14
- Wandless TJ (1996) SH2 domains: a question of independence. *Current Biology: CB* **6**: 125-127
- Wang B, Lemay S, Tsai S, Veillette A (2001) SH2 domain-mediated interaction of inhibitory protein tyrosine kinase Csk with protein tyrosine phosphatase-HSCF. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 1077-1088

- Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**: 119-123
- WHO Fact Sheet N°115 (January 2012) [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index)
- Whitaker M, Larman MG (2001) Calcium and mitosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **12**: 53-58
- Wieser R, Wrana JL, Massagué J (1995) GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *The EMBO Journal* **14**: 2199-2208
- Williams DL, Sayed AA, Bernier J, Birkeland SR, Cipriano MJ, Papa AR, McArthur AG, Taft A, Vermeire JJ, Yoshino TP (2007) Profiling *Schistosoma mansoni* development using serial analysis of gene expression (SAGE). *Experimental Parasitology* **117**: 246-258
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**: 341-347
- Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW (2004) COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **10**: 2323-2326
- Xiao SH, Keiser J, Chen MG, Tanner M, Utzinger J (2010) Research and development of antischistosomal drugs in the People's Republic of China a 60-year review. *Advances in Parasitology* **73**: 231-295
- Yamada H, Iwase S, Nagai M, Nemoto T, Sekikawa T, Takahara S, Nakada S, Furukawa Y, Horiguchi-Yamada J (1996) Herbimycin A down-regulates messages of cyclin D1 and c-myc during erythroid differentiation of K562 cells. *International Journal of Hematology* **65**: 31-40
- Yamaki H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H (1989) Inhibition of c-myc gene expression in murine lymphoblastoma cells by geldanamycin and herbimycin, antibiotics of benzoquinoid ansamycin group. *The Journal of Antibiotics* **42**: 604-610
- Yamanaka T, Ohno S (2008) Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* **13**: 6693-6707
- Yang L, Moses HL (2008) Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer research* **68**: 9107-9111
- Yasumi M, Sakisaka T, Hoshino T, Kimura T, Sakamoto Y, Yamanaka T, Ohno S, Takai Y (2005) Direct binding of Lgl2 to LGN during mitosis and its requirement for normal cell division. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 6761-6765
- You H, Gobert GN, Jones MK, Zhang W, McManus DP (2011) Signalling pathways and the host-parasite relationship: putative targets for control interventions against schistosomiasis: signalling pathways and future anti-schistosome therapies. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **33**: 203-214
- Young KG, Copeland JW (2010) Formins in cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1803**: 183-190

Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, Li Y, Cantacessi C, Hall RS, Xu X, Chen F, Wu X, Zerlotini A, Oliveira G, Hofmann A, Zhang G, Fang X, Kang Y, Campbell BE, Loukas A, Ranganathan S, Rollinson D, Rinaldi G, Brindley PJ, Yang H, Wang J, Gasser RB (2012) Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nature Genetics* **44**: 221-225

Yun JJ, Heisler LE, Hwang, II, Wilkins O, Lau SK, Hyrcza M, Jayabalasingham B, Jin J, McLaurin J, Tsao MS, Der SD (2006) Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **34**: e85

Zon LI, Dorfman DM, Orkin SH (1989) The polymerase chain reaction colony miniprep. *BioTechniques* **7**: 696-698

## 8 Abkürzungen und Einheiten

### 8.1 Allgemeine Abkürzungen

<i>A. mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>
ABAM	Antibiotikum/Antimycotikum
Abb.	Abbildung
Abi	<i>Abelson interactor</i>
Act(R)	Activin-(Rezeptor)
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AS	Aminosäure
AS	Aminosäuren
BD	Bindungsdomäne
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. sinensis</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>
cDNA	komplementären DNA-Stranges
CDS	coding sequence
CTK	Zelluläre Tyrosinkinase
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
Dia	Diaphanous
DIG	Digoxigenin
DLG	<i>Discs large</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGFR-BD	EGFR-Bindedomäne
Eps8	<i>EGFR pathway substrate 8</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid



EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FKBP12	FK506 Bindeprotein 12
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
GDF	<i>Growth and Differentiation Factor</i>
GEO	<i>gene expression omnibus</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GVBD	<i>Germinal Vesicle Breakdown</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
Herb A	Herbimycin A
His	Histidin
I-Smad	<i>inhibitory</i> Smads
IC50	<i>Inhibitory concentration</i> 50
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IR	Insulinrezeptor
ITPG	Isopropylthiogalactosid
konz.	konzentriert
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase-Strukturgen
LAP	Latenz-assoziierte Protein
LB	Luria Broth
Leu	Leucin
LGL	<i>Lethal giant larvae</i>
LiAc	Lithium-Acetat
LLGL	<i>Lethal giant larvae 2 domain</i>
LLR	<i>Leucin rich regions</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MAGUK	Membranassoziiert Guanylatkinase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning sites</i>
MH	Mad Homologie
MH	Mad Homologiedomäne
MIS	<i>Müllerian Inhibiting Substance</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCS	<i>newborn calf serum</i>
OD	optische Dichte
Oligo d(T)	Oligonucleotid aus Desoxythymidin-Nukleotiden
ONPG	$\sigma$ -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	Proteindisulidisomerase
PDZ	<i>Postsynaptic density, Discs large, Zonula occludentes</i>

## Abkürzungen & Einheiten

---

PEG	Polyethylenglycol
PTB	Phosphotyrosinbindedomäne
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonucleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.	siehe
<i>S. mansoni</i>	Schistosoma mansoni
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SAM-PNT	<i>steril alpha motif-pointed</i>
Scrib	Scribble
SD	<i>Synthetic Dropout</i>
SH	Src homology domain
siRNAs	<i>small interfering RNA</i>
Sos-1	<i>Son of sevenless</i>
SSC	<i>Saline sodium citrate buffer</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquatus</i>
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TK	Tyrosinkinase
TRIKI	TGFβ RI Kinase-Inhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TWEEN	Poloxyethylenglykolsorbitol-monooleat
TβRI	TGFβ-Rezeptor
u.a.	unter anderem
UAS	<i>upstream activating sequences</i>
üN	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VKR	<i>Venus Flytrap Kinase Receptor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-galacto-pyranosid
<i>X. tropicalis</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>
Y2H	<i>Yeast two Hybrid</i>
Y3H	<i>Yeast three Hybrid</i>
YPD(A)	<i>Yeast extract Peptone Dextrose (Adenin)</i>

z.B.	zum Beispiel
β-Gal	β-Galaktosidase

## 8.2 Einheiten

°C	Grad Celcius
cm	Zentimeter
d	Tage
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunden
k	Kilo
l	Liter
M	Molar
m	Milli
M	Mega
min	Minuten
N	Normal
n	Nano
OD	optische Dichte
rpm	rounds per minute
sec	Sekunde
t	Zeit
T <sub>m</sub>	<i>temperature melting point</i>
U	Unit
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
μ	mikro

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopische Darstellung adulter, gepaarter Schistosomen .....	6
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i> .....	8
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung von TGF $\beta$ -Signalwegen .....	14
Abbildung 1-4: Strukturformel des verwendeten ATP-Kompetitors TRIKI .....	24
Abbildung 1-5: Strukturformel des verwendeten Inhibitors für Src-Tyrosinkinasen, Herbimycin A .....	25
Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines Saugblots .....	60
Abbildung 2-2: Prinzip des GAL4-basierten <i>Yeast Two-Hybrid</i> Systems .....	63
Abbildung 2-3: Veränderung der Oocyten infolge des <i>Germinal Vesicle Breakdowns</i> (GVBD) .....	66
Abbildung 2-4: Fließdiagramm der einzelnen Arbeitsschritte der Microarray-Analyse .....	66
Abbildung 3-1: Ausschnitt des Alignments der GS-Motive sowie Teile der intrazellulären Bereiche der TGF $\beta$ - Rezeptoren Typ I (T $\beta$ RI) von <i>Homo sapiens</i> und <i>Schistosoma mansoni</i> .....	72
Abbildung 3-2: <i>Germinal Vesicle Breakdown</i> -Experimente TRIKI behandelter Oocyten, die eine konstitutiv aktive (SmT $\beta$ RI <sup>7D</sup> ) oder inaktive (SmT $\beta$ RI <sup>VVAAAVV</sup> ) Variante des SmT $\beta$ RI exprimieren .....	73
Abbildung 3-3: Ermittelte Eizahl pro Schistosomenpaar pro 48 h nach entsprechender Inhibitorbehandlung ...	75
Abbildung 3-4: Mitotische Aktivität nach vorangegangener Behandlung mit Herbimycin A, bzw. der Kombination von Herbimycin A und TRIKI .....	76
Abbildung 3-5: Mitotische Aktivität nach vorangegangener Behandlung mit TRIKI .....	76
Abbildung 3-6: Mikroskopische Untersuchungen der Reproduktionsorgane nach 48-stündiger Behandlung mit DMSO, TRIKI, Herbimycin A oder der Kombination beider Inhibitoren .....	78
Abbildung 3-7: Mikroskopische Untersuchungen des Darmtrakts inhibitorbehandelter Schistosomen nach einer Behandlungsdauer von 5 und 6 Tagen .....	80
Abbildung 3-8: Vergleich der signifikant differentiell transkribierten Gene nach Stimulation mit hTGF $\beta$ , bzw. Inhibition mit TRIKI in Form einer hierarchischen Anordnung .....	85
Abbildung 3-9: Schnittmengendiagramm der differentiell transkribierten Gene ( $q \leq 0,03$ ) der verschiedenen Inhibitorbehandlungen .....	89
Abbildung 3-10: qPCR und Microarray-Resultate ausgewählter Gene zur Verifizierung der differentiellen Transkription nach TRIKI-Behandlung .....	93
Abbildung 3-11: qPCR und Microarray-Resultate ausgewählter Gene zur Verifizierung der differentiellen Transkription nach Herbimycin A-Behandlung .....	95
Abbildung 3-12: qPCR und Microarray-Resultate ausgewählter Gene zur Verifizierung der differentiellen Transkription nach kombiniert TRIKI und Herbimycin A-Behandlung .....	97
Abbildung 3-13: Übersicht repräsentativer differentiell transkribierter Gene der Eischalsynthese nach vorangegangenen Inhibitorbehandlungen .....	98
Abbildung 3-14: Phylogenetisches Cladogramm der SH3-Domäne verschiedener Eps8-Moleküle .....	104

Abbildung 3-15: Alignment von SmEps8-Klonen identifiziert im Y3H-Screening ( <i>Prey</i> -Sequenz) bzw. annotiert in der Datenbank (XP_002574647 und CCD60001) .....	105
Abbildung 3-16: $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filter- und $\beta$ -Gal Flüssigassay der SmEps8- und SmTK3-Proteininteraktionen .....	107
Abbildung 3-17: Transkriptionsanalysen von SmEps8 und SmActin .....	108
Abbildung 3-18: <i>In situ</i> -Lokalisation von SER auf Gewebeschnitten von adulten Schistosomen .....	109
Abbildung 3-19: Schematischer Aufbau von SmEps8 bzw. den SERs und Ergebnisse der $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filterassays von SmEps8-SER-transformierten AH109-Zellen.....	111
Abbildung 3-20: Schematischer Aufbau von SmEps8 und SmAbi-2 und Ergebnisse der $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filterassays von SmEps8-SmAbi-2-transformierten AH109-Zellen .....	112
Abbildung 3-21: Schematischer Aufbau des schistosomalen <i>Discs large</i> Proteins (SmDLG).....	114
Abbildung 3-22: Schematischer Aufbau von SmScrib, SmDLG und SmLGL und erste Ergebnisse der $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Filterassays dieser Interaktionsstudien.....	116
Abbildung 3-23: <i>In situ</i> -Lokalisation von Scribble (SmScrib) und <i>Lethal giant larvae</i> (SmLGL) auf Gewebeschnitten von adulten Schistosomen .....	118
Abbildung 3-24: Strangspezifische RT-PCRs zur Detektion von SmLGL <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Transkripten .....	119
Abbildung 3-25: Ergebnisse der (semi)quantitativen RT-PCRs zur Bestimmung der Transkriptionsrate aus RNAi-Experimenten adulter Schistosomen mit dsRNAs gegen SmDLG, SmScrib bzw. SmLGL .....	120
Abbildung 5-1: Hierarchische Anordnung differentiell transkribierter Gene nach (A) TRIKI-, (B) Herb A- und (C) Kombinationsbehandlung, $q \leq 0,03$ .....	151

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Einteilung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Behandlung mit TRIKI, $q \leq 0,03$ .....	83
Tabelle 3-2: Einteilung signifikant differentiell transkribierter Gene nach Herbimycin A-Behandlung, $q \leq 0,03$ .....	85
Tabelle 3-3: Einteilung signifikant differentiell transkribierter Gene nach kombinierter Behandlung mit TRIKI und Herbimycin A , $q \leq 0,03$ .....	87

### 10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christin Buro, geboren am 04.02.1983 in Osterburg, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 14. Februar 2013

---

Christin Buro

## 11 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

### 11.1 Publikationen

**C. Buro**, C. Burmeister, C. Henrich, G. Lang, T. Quack, S. Beckmann, C.G. Grevelding "Identification and characterisation of an epidermal growth factor receptor substrate 8 (SmEps8) as the most abundant upstream interaction partner of the Src tyrosine kinase SmTK3" In Vorbereitung

**C. Buro**, K.C. Oliveira, S. Leutner, S. Beckmann, Z. Lu, C. Dissous, K. Cailliau, S. Verjovski-Almeida, C.G. Grevelding "Transcriptome analyses of inhibitor-treated schistosome females provide evidence for cooperating Src-kinase and TGF $\beta$  receptor pathways controlling mitosis and eggshell formation." In Revision

S. Beckmann, T. Quack, C. Burmeister, **C. Buro**, S. Hahnel, T. Long, C. Dissous, C.G. Grevelding (2011): "Sex in Schistosomes – Signaling Mechanisms in the Female Gonads." Parasitology Research Monographs

S. Beckmann, **C. Buro**, J. Hirzmann, C. Dissous, C.G. Grevelding (2010): "The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in regulation of spermatogenesis and oogenesis." PLoS Pathogens 6, e1000769.

S. Beckmann, T. Quack, C. Burmeister, **C. Buro**, T. Long, C. Dissous, C.G. Grevelding (2010): "*Schistosoma mansoni*: Signal transduction processes during the development of the reproductive organs." Parasitology 137, 497-520. (Review; Titelblatt)

**C. Buro**, S. Beckmann, T. Quack, C.G. Grevelding (2010): "Photometric quantification of the  $\beta$ -galactosidase activity for the analysis of interaction forces between signal from *Schistosoma mansoni* in the Eppendorf BioPhotometer plus." Applications, Nr. 221, Eppendorf

### 11.2 Kongressbeiträge

**C. Buro**, K.C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, C.G. Grevelding (21.09. – 22.09.2011) „Molecular analyses of female schistosomes after inhibitor treatment“; 4th GGL Conference on Life Sciences, Gießen

**C. Buro**, K.C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, C.G. Grevelding (12.04. – 14.04.2011) "Transcriptom analyses of female schistosomes after inhibitor treatment"; British Society for Parasitology Spring and Malaria Meeting, Nottingham (Großbritannien)

S. Hahnel, T. Quack, S. Leutner, **C. Buro**, C.G. Grevelding (12.04. – 14.04.2011) “*In silico* identification and further investigation of G protein-coupled receptors from adult *Schistosoma mansoni*”; British Society for Parasitology Spring and Malaria Meeting, Nottingham (Großbritannien)

C.G. Grevelding, **C. Buro**, T. Quack, S. Hahnel, C. Dissous, K.C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, S. Beckmann (12.04. – 14.04.2011) “Signaling in *Schistosoma mansoni* gonads unravelled by inhibitor and RNAi approaches”; British Society for Parasitology Spring and Malaria Meeting, Nottingham (Großbritannien)

S. Beckmann, **C. Buro**, K.C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, C. Dissous, K. Cailliau, E. Browaeys, S. Frank, R. Geyer, C.G. Grevelding (17.03. – 19.03.2011) “Schistosome Abl- and Abl-like kinases are targets of the cancer drug Glivec (Imatinib) causing fatal effects on adult worms in vitro”; 12<sup>th</sup> Drug Design & Development Seminar (DDDS) of the DGP, Heidelberg

K.C. Oliveira, M.L.P. Carvalho, S. Beckmann, S. Leutner, **C. Buro**, C.G. Grevelding, S. Verjovski-Almeida (05.09. – 10.09.2010) “Molecular characterization of the TNF-alpha receptor in *Schistosoma mansoni* adult worms”; Molecular and cellular biology of helminth parasites VI, Hydra (Griechenland)

C.G. Grevelding, **C. Buro**, T. Quack, C. Burmeister, C. Dissous, K.C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, S. Beckmann (05.09. – 10.09.2010) “Inhibitor and RNAi approaches to investigate signaling molecules in *Schistosoma mansoni*”; Molecular and cellular biology of helminth parasites VI, Hydra (Griechenland)

**C. Buro**, K.C. Oliveira, C. Burmeister, S. Beckmann, S. Verjovski-Almeida, C.G. Grevelding (30.09. – 01.10.2010) „Microarray analyses of inhibitor-treated adult *Schistosoma mansoni*“; 3<sup>rd</sup> GGL Conference on Life Science, Gießen

**C. Buro**, K.C. Oliveira, C. Burmeister, S. Beckmann, S. Verjovski-Almeida, C.G. Grevelding (16.03. – 20.03.2010) „Molecular and morphological analyses of inhibitor-treated adult *Schistosoma mansoni*“; 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Düsseldorf

S. Beckmann, **C. Buro**, C. Dissous, C.G. Grevelding (16.03. – 20.03.2010) „The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of gametogenesis“; 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Düsseldorf

S. Hahnel, T. Quack, S. Leutner, **C. Buro**, C.G. Grevelding (16.03. – 20.03.2010) „ In silico identification and first transcriptional analyses of G protein-coupled receptors (GPCRs) in adult *Schistosoma mansoni*“; 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Düsseldorf



**C. Buro**, C. Burmeister, S. Beckmann, J. Knobloch, C.G. Grevelding (13.03.-16.03.2010) „Characterisation of genes specifically expressed in the reproductive organs of female schistosomes”; DGP 4<sup>th</sup> Short Course for Young Parasitologists, Düsseldorf

**C. Buro**, S. Beckmann, C.G. Grevelding (15.01.2010) „Characterisation of two interaction partners of the cellular protein tyrosine kinase SmTK3”; Seminarreihe „Current topics in infection biology“, Gießen

**C. Buro**, S. Beckmann, C. Burmeister, K.C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, C.G. Grevelding (30.09. – 01.10.2009) „Inhibitor treatment of adult *S. mansoni* and yeast 2/3 hybrid interaction studies”; 2<sup>nd</sup> GGL Conference on Life Science, Gießen

S. Beckmann, T. Quack, C. Burmeister, **C. Buro**, T. Long, C. Dissous, C.G. Grevelding (20.09. – 23.09.2009) „*Schistosoma mansoni*: Signal transduction processes during development of the reproductive organs”; 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)“, Göttingen

S. Beckmann, T. Quack, C. Burmeister, **C. Buro**, J. Knobloch, T. Long, C. Dissous, C.G. Grevelding (17.09. – 18.09.2009) „Signal transduction processes during the female-gonad development in *Schistosoma mansoni*”; Schistosoma Molecular Tool Box Workshop, San Francisco (USA)

C.G. Grevelding, S. Beckmann, C. Burmeister, **C. Buro**, C. Dissous, T. Quack (26.07. – 31.07.2009) „Cellular kinases involved in gonad differentiation of *Schistosoma mansoni*”; XI International Symposium on Flatworm Biology”, Diepenbeek (Belgien)

**C. Buro** (30.06.2009) „The molecular genetic effects after treatment with different inhibitors and characterization of gonad specific expressed genes from *Schistosoma mansoni*”; Retreat of the GGL-section 2 „Infection and immunology“, Gießen

### 12 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. C.G. Grevelding möchte ich mich für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, sowie den positiven Glauben an mich und meine Daten danken.

Bei Frau Prof. Dr. T.E. Trenczek möchte ich mich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit innerhalb des Fachbereichs Biologie bedanken.

Ein weiteres Dankeschön für die zahlreiche Unterstützung im Labor geht an Gabriele Lang, Christine Henrich, Christina Scheld, Bianca Kulik und Brigitte Hofmann. Ihr habt mir immer mit eurer Erfahrung, fachlicher Unterstützung und persönlichen Ratschlägen zur Seite gestanden.

Bei Dr. Svenja Beckmann und Dr. Thomas Quack möchte ich mich für viele inspirierende Gespräche mit neuen Ideen zu meiner Arbeit bedanken. Ihr habt mir die Möglichkeit gegeben, an euren (wissenschaftlichen und persönlichen) Erfahrungen teilzuhaben und mich weiter zu entwickeln. Daneben konnte ich mich euch die Höhen und Tiefen der Promotion durchleben, vielen Dank dafür.

Für die Möglichkeit alles über Microarrays zu lernen möchte ich mich bei Dr. Sergio Verjovski-Almeida und PhD Katia C. Oliveira, sowie der gesamten Arbeitsgruppe bedanken.

Meinen langjährigen „Leidensgenossen“ Silke Leutner und Steffen Hahnel gilt ein großes Dankeschön für die gute Zeit mit unendlich vielen „Microarray-Fachgesprächen“ und „Phänotypbesprechungen“. Ihr habt meine Promotion sowohl wissenschaftlich als auch zwischenmenschlich sehr bereichert und dafür danke ich euch. Daneben möchte ich mich bei Dr. Sandra Frank, Zhigang Lu, Dr. Claudia Schulz, Eun-Ju Kim, Dr. Denis Wolf und Dr. Jan H. Behrendt für lustige Stunden zum Ausgleich von der Laborarbeit danken. Ich bin froh, dass ich euch während der letzten Jahre kennenlernen konnte. Mit euch, Dr. Verena Gelmedin und Julia Schulz, habe ich leider nur eine kurze Zeit verbracht, aber dennoch vielen Dank für eure Unterstützung. Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie danke ich für die gute Zeit, die freundliche Arbeitsatmosphäre und die lustigen Betriebsausflüge.

Der letzte Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich in dieser intensiven Zeit immer unterstützt haben. Durch eure Geduld, Rückhalt und Verständnis habt ihr mir in den letzten Jahren immer wieder neue Kraft und Mut gegeben. Ein besonderer Dank geht dabei an meinen Lebensgefährten für die bedingungslose Unterstützung und das Tolerieren aller Launen. Vielen Dank für alles!